

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LAS PULGAS DEL
GÉNERO *NEOTYPHLOCERAS* (SIPHONAPTERA: CTENOPHTHALMIDAE) DE LA
PATAGONIA, ARGENTINA**

Trabajo Final de Grado de la alumna



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LAS PULGAS DEL
GÉNERO *NEOTYPHLOCERAS* (SIPHONAPTERA: CTENOPHTHALMIDAE) DE LA
PATAGONIA, ARGENTINA**

Trabajo Final de Grado de la alumna

CATALINA LOPEZ LINARES

Aprobada por el Tribunal Evaluador

Dra. María Fernanda
López Berrizbeitia

Evaluadora

Dra. María Cecilia
Ezquiaga

Evaluadora

Dra. Silvina Goenaga

Evaluadora

Dra. Juliana Patricia Sánchez

CEBIO-CIT NOBA (CONICET-UNNOBA)

Directora

Dra. Diana Belén Acosta

CEBIO-CIT NOBA (CONICET-UNNOBA)

Co-Directora

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino

ESTA TESIS VA DEDICADA A MI ABUELA LUISA, UNA DE
LAS PRIMERAS PERSONAS EN CONSOLARME CUANDO EL ESTUDIO
SE ME HIZO CUESTA ARRIBA.

POR UNOS POCOS MESES NO FESTEJAMOS ESTE LOGRO
JUNTAS.

"FÍSICAMENTE HOY YA NO ESTÁS, PERO EN MI CORAZÓN
SIEMPRE VAS A ESTAR" SÉ QUE ESTARÍAS ORGULLOSA PORQUE
LO LOGRÉ, ASÍ QUE ESTE MÉRITO ES PARA VOS, ABUELA.

SIEMPRE TE VOY A LLEVAR CONMIGO.

AGRADECIMIENTOS

En esta tesis quiero agradecerles de una manera especial a mis papás, porque sin ellos no hubiera podido obtener la licenciatura. Por todo lo que me enseñaron, desde chiquita, por los buenos hábitos, por los valores que me inculcaron, porque me demostraron que el esfuerzo tiene su recompensa, porque me dieron todo lo que tenían y más para que yo pueda estudiar. Gracias por haber priorizado siempre mi educación. A ellos, a ellos sí que les debo un GRACIAS enorme. Gracias por haberme llevado al club desde que nací, ese espacio que fue mi cable a tierra durante todos los años de estudio, porque hacer deporte fue clave para que pudiera terminar la carrera. Los amo.

Quiero darte las gracias, mamá, por enseñarme desde niña a ser responsable, por escucharme dar las mismas lecciones más de una vez desde que iba al colegio primario (creo que a mi primera lección, del oso hormiguero, se la relaté unas 10 veces). Gracias por tu paciencia infinita, por acompañarme en cada rendida y en cada día universitario, por esperarme con la comida lista y la ropa limpia, por darme fuerzas para seguir cuando la meta se me hacía lejana, por ir tachando juntas las materias que me faltaban para recibirme, a la par de “ya falta menos, Catita, ya falta menos”, por acompañarme en cada logro y paso dado, como si fuera propio. Gracias por ayudarme a tomar las decisiones correctas. ¿Te acordás cuando íbamos en camino al club, y te conté que había tenido una clase de Genética en el colegio, y que me había encantado? ¿Y que juntas supimos que esta carrera era la ideal para mí? Mami, a vos mami te debo lo que soy. Gracias por haberme formado, porque por vos he llegado hasta acá, gracias por motivarme siempre. Quiero decirte que estoy orgullosa de que seas mi madre.

Gracias, papá, por haber trabajado incansablemente para que no me falte nada, ni a mí ni a mis hermanas, porque cuando te he necesitado solo una llamada ha sido suficiente para que me vayas a buscar, en auto, en moto, llueva, truene o hagan 40°C, siempre supe que podía contar con tu presencia. Papi, gracias a vos que te alegrabas genuinamente de mis avances en la carrera, por más de que habían sido pequeños, por escucharme contar anécdotas de la facultad, aunque fueran repetidas. Gracias pa por acompañarme siempre, desde chiquita, en cada paso que di. Por eso hoy también te quiero agradecer especialmente, porque yo soy quien soy gracias a tu apoyo y a que

estuviste junto a mí desde que tengo uso de razón. Gracias pa, por permitirme haber llegado lejos y por darme la oportunidad de estudiar.

Un párrafo aparte va dedicado a mis hermanas, Manu y Marti, a esas 2 personas que han estado codo a codo junto a mí, desde que tengo uso de razón, por quienes también hoy en día soy quién soy. Gracias por ser mi fuente de inspiración, por ser mis ejemplos a seguir, por escucharme dar las lecciones desde que soy chiquita (cómo me gustaba estudiar), por alegrarse de cada logro como si fuera propio, por acompañarme siempre en cada paso que doy, por darme fuerzas para seguir cuando el cansancio quería ganarme. Las amo.

Gracias Marti por haberme ayudado a organizarme con el estudio, por brindarme tu experiencia para que yo sea una mejor estudiante, por haber secado mis lágrimas ese primer año que tan duro fue, por haber ido tachando cada materia rendida del plan académico, por haberme acompañado en muchas tardes de estudio, por haberme prestado tus resúmenes y haberme enseñado a “ir al grano”, por las charlas en los pasillos de la UNNOBA, por escucharme acerca de cuántos temas había estudiado, cuántos me faltaban y hasta de qué se trataban. Gracias por estar siempre junto a mí.

Gracias Manu por alegrarte junto a mí por cada logro académico, por preguntarme siempre después de rendir cómo me había ido, también por escucharme sobre los temas que me faltaban y los que ya había estudiado, por proponerme de hacer planes los domingos para que despejara mi cabeza del estudio y disfrutara la vida, por mostrarme ese día que yo estaba muy cansada de estudiar, a Juanita que parecía un peluche, pero era una cachorrita de 45 días. Gracias por cebarme mates con torta casera en pandemia, cuando yo rendía. Esos gestos son los que a mí me dieron fuerzas para poder seguir en días difíciles. Gracias por acompañarme en cada logro y en cada derrota.

Quiero agradecerte también a vos Leito, mi cuñado, que sos parte de mi familia y te quiero como a un hermano. Me acuerdo que a uno de mis primeros exámenes de la universidad lo rendí sentada al lado tuyo y que la noche anterior tomamos helado, mientras yo repasaba. A esos momentos me refiero cuando digo que gracias a mi gente, el camino se hizo más llevadero. Gracias por alegrarte de mis logros académicos y por tenerme fe en que lo iba a lograr. Te quiero mucho.

Quiero darle las gracias a mi tía Lili, por interesarse en cómo venía con la tesis, por tenerme fe en que lo iba a lograr y por estar siempre para mí. Te quiero mucho.

Este párrafo va dedicado a ustedes, mis amigas de la facultad, Agus y Yami. Gracias por todas las risas compartidas, por todos los lindos y no tan lindos momentos que hemos vivido: momentos de estrés, momentos en los que pensábamos en cuándo íbamos a terminar de rendir, momentos de fiesta, momentos de motivación mutua, mates durante las cursadas, idas en colectivo. Siempre siendo nuestras mejores cómplices y apoyándonos. Con ustedes he compartido muchos años de mi carrera, por no decir casi todos, y afirmo que se me hizo más llevadera y el estudio fue más lindo sabiendo que a mi lado las tenía a ustedes, amigas. La universidad además de darme un título me dio unas amigas de oro. Las quiero muchísimo.

Gracias a Marcos, mi primer compañero de trabajos prácticos en la facultad, con el que hice todos los trabajos grupales de los 6 años de cursada, en los que estuvimos codo a codo, complementándonos académicamente de una forma espectacular. Entre videollamada, diapositivas, idas en colectivo y a pie, repasando los temas antes de rendir, y siempre entre risas. Sin dudas, un compañero y amigo clave en mi paso por la universidad.

Quiero agradecerle especialmente a Diana, la mejor codirectora que podría haber elegido. Gracias por enseñarme a razonar y a justificar mis respuestas cuando fuiste mi profe, por tu paciencia infinita y tus ganas de enseñarme. Gracias por hacer que mi tesis sea posible. Quiero destacar tu buena predisposición desde que te pregunté si podía hacer mi tesis con vos. Quiero agradecerle por enseñarme todo lo que sabías para lograr que sea una profesional preparada para la vida laboral, por haberme enseñado cada detalle de cada técnica, por entenderme cuando estaba cansada o con la mente dispersa, por motivarme a seguir cuando los resultados que obteníamos no eran los esperados, por aconsejarme y compartirme tus experiencias para que sea una buena profesional y también una buena persona. Gracias por estar siempre al pie del cañón, por tus palabras de apoyo y por haber sabido ponerte en mi lugar. Creo que mi experiencia de tesis fue más linda porque la hice con vos, porque fuiste mi inspiración en muchas oportunidades. Me gustaría destacar también las risas y los lindos momentos compartidos en todos estos meses. Te quiero mucho.

Quiero darle las gracias a la gran familia del CEBIO, porque con cada uno de ellos mi experiencia de tesis mejoró un poquito. Gracias por los saludos matutinos y vespertinos, que me hicieron sentir parte desde el día uno de este lugar pequeño físicamente pero enorme en mi corazón. Gracias a todos por su buena predisposición, por haberme incluido sin problemas en este grupo de trabajo y por estar siempre que los necesité. Quiero agradecerles especialmente a Lucy, Emi, Mati, Charly, Nico, Agus, Majo, Mari y Agus, con quienes tengo una relación muy especial. Gracias por sus palabras de apoyo cuando me veían caminar por el pasillo decepcionada porque la PCR no arrojaba resultados positivos, gracias por compartirme sus experiencias y hasta reactivos para ayudarme a que mi tesis finalice. Gracias por motivarme. Los quiero.

Quiero agradecerle a mi directora Juli, por brindarme sus muestras y su amplio conocimiento para que mi tesis sea posible. Gracias por enseñarme que los detalles son los que marcan la diferencia y por demostrarme que las pulgas pueden ser muy interesantes, por más chiquitas que sean. Gracias por tus correcciones, por tu paciencia y por ayudarme a ser una mejor estudiante, ahora profesional.

Quiero agradecerle también a mis compañeros de cursada, porque, sin dudas, sin ellos la experiencia no hubiera sido tan buena. Gracias por cada risa, mate y resumen compartido, los voy a llevar por siempre en mi corazón.

Gracias a mis amigas de la vida, Vivi, Iari, Joha y Romi, a quienes conocí cuando estaba cursando los primeros años de la facultad y fueron parte de mi despeje en muchas oportunidades. A ellas que yo sé que están aunque no nos veamos tan seguido, que solo basta un mensaje para coordinar una juntada, ponernos al día y escuchar nuestras anécdotas eternas pero divertidas. Las quiero mucho.

Por último y no menos importante, quiero agradecerle a Mati. Gracias por hacer que mis días sean más lindos, por tener fe en que iba a poder recibirme, por motivarme y escucharme siempre que lo necesité. Gracias por todas las risas y momentos lindos. Gracias por ser vos. Te quiero un montón.

Gracias a la UNNOBA por darme la oportunidad de estudiar la carrera que me gusta, por su calidad profesional y por la calidad humana de sus profesores. Orgullosa de haber podido disfrutar de la educación pública en mi ciudad.

RESUMEN

El género de pulgas *Neotyphloceras* (Insecta: Siphonaptera: Ctenophthalmidae) incluye 7 especies y subespecies parásitas de roedores. Su distribución geográfica abarca desde Venezuela hasta el sur de Chile y Argentina e incluye un extenso rango de hábitats que varían en diversidad. En la Patagonia argentina, las especies de este género son las más abundantes y prevalentes en los ensambles de pulgas asociados a roedores. Históricamente, la identificación de las especies y subespecies de *Neotyphloceras* se basó en la caracterización de la compleja morfología de los segmentos abdominales modificados y genitalia, principalmente de los machos, ya que en las hembras de varias especies no se han descrito diferencias diagnósticas significativas. Recientes estudios moleculares han demostrado ser una herramienta complementaria eficaz para esclarecer la taxonomía de especies de pulgas de la familia Ctenophthalmidae. En este contexto, el objetivo de este trabajo fue ampliar el conocimiento sobre el género *Neotyphloceras* mediante la caracterización morfológica y molecular empleando el marcador mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) de especímenes asociados a poblaciones de roedores sigmodontinos de la Patagonia argentina.

Se analizaron 58 ejemplares machos y hembras de *Neotyphloceras* spp. El estudio morfológico realizado, examinando las características diagnósticas que recopilan la información existente para las descripciones y redescripciones de todas las especies y subespecies del género, permitió la identificación a nivel específico de 29 ejemplares de *Neotyphloceras crackensis* y 11 de *Neotyphloceras pardinasi*.

Para el estudio molecular, se extrajo ADN genómico de 45 muestras de *Neotyphloceras* spp. para la posterior amplificación y secuenciación de un fragmento de 453 pb de COI. La secuenciación fue exitosa en 12 muestras, las cuales se agruparon en 10 haplotipos, con 35 sitios polimórficos e índices de diversidad haplotípica y nucleotídica de 0,970 y 0,032, respectivamente, lo cual indicaría que existe mucha variación entre los haplotipos. Al incorporar al análisis la única secuencia del género *Neotyphloceras* reportada hasta el momento, *Neotyphloceras crassispina* ssp., las 13 secuencias fueron agrupadas en 11 haplotipos. Esta secuencia presentó 217 sitios variables en comparación a las secuencias de este estudio. Los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica

también fueron superiores a los hallados en el set de datos anterior (0,974 y 0,1168, respectivamente).

Las relaciones haplotípicas y los árboles filogenéticos agruparon a las muestras en 2 grandes clados o grupos, encontrándose las secuencias de este estudio en un grupo mientras que en el otro se encuentra la secuencia de *Neotyphloceras* reportada. Asimismo, agrupa de manera incorrecta las secuencias de ejemplares que comparten una determinada familia, género o especie. Esto nos estaría indicando una mala resolución sistemática del fragmento estudiado con el marcador molecular COI para este grupo de taxones.

Este trabajo de tesis es un gran aporte al conocimiento molecular del género *Neotyphloceras*, debido a que solo existe una única secuencia reportada para el mismo, disponible en *Genbank*. Al mismo tiempo, sugiere la incorporación al estudio morfológico, de otros marcadores mitocondriales y/o nucleares, más informativos, que permitan corroborar la variación entre haplotipos y discriminar de manera más eficiente las especies de pulgas. Este estudio es el primero en Argentina que involucra tantos aspectos morfológicos como genéticos en los sifonápteros. Considerando que Argentina presenta la mayor diversidad de pulgas de Sudamérica, esta tesis sienta las bases para futuras investigaciones que permitirán generar un gran caudal de información de referencia para la región.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS PULGAS.....	1
1.2 MORFOLOGÍA.....	2
1.3 CICLO BIOLÓGICO.....	4
1.4 TAXONOMÍA.....	5
1.5 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y HOSPEDATORIA.....	6
1.6 DIVERSIDAD DE PULGAS EN LA PATAGONIA.....	7
1.7 PRINCIPALES HOSPEDADORES DE PULGAS: ROEDORES SIGMODONTINOS.....	8
1.8 IMPORTANCIA SANITARIA DE LAS PULGAS PARÁSITAS DE ROEDORES.....	9
1.9 MARCADORES MOLECULARES.....	10
2. HIPÓTESIS.....	13
3. OBJETIVOS.....	13
3.1 OBJETIVO GENERAL.....	13
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
4.1 ÁREA DE ESTUDIO.....	14
4.2 COLECCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	14
4.3 TRATAMIENTO E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA A PARTIR DE LA MORFOLOGÍA DE LAS PULGAS.....	15

4.4 EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO.....	16
4.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA EL MARCADOR MOLECULAR CITOCROMO OXIDASA I.....	16
4.6 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	17
5. RESULTADOS.....	18
5.1 CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA.....	18
5.2 EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DEL MARCADOR COI.....	31
5.3 ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA.....	35
5.4 RELACIONES HAPLOTÍPICAS.....	36
5.5 ANÁLISIS FILOGENÉTICO.....	39
6. DISCUSIÓN.....	42
7. CONCLUSIONES.....	51
8. BIBLIOGRAFÍA.....	52
9. ANEXOS.....	65
ANEXO 1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO MEDIANTE CHELEX X100 MODIFICADO.....	65
ANEXO 2. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO MEDIANTE CTAB (DOYLE Y DOYLE, 1987).....	66
ANEXO 3. CROMATOGRAMAS OBTENIDOS MEDIANTE SECUENCIACIÓN ESTÁNDAR.....	68
ANEXO 4. ÁRBOL FILOGENÉTICO OBTENIDO A PARTIR DE UN FRAGMENTO DE 415 PB DEL GEN COI.....	69
ANEXO 5. ÁRBOL FILOGENÉTICO A PARTIR DE UN FRAGMENTO DE 635 PB DEL GEN COI.....	70

1. INTRODUCCIÓN

1.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS PULGAS

Las pulgas (Insecta: Siphonaptera) son un grupo de artrópodos altamente especializados de ectoparásitos hematófagos de aves y, principalmente, mamíferos. Este orden comprende cerca de 2500 especies agrupadas en más de 200 géneros y 16 familias (Durden y Hinkle, 2019) y, de éstas, alrededor de 130 se registran en Argentina (Lareschi *et al.*, 2016; López Berrizbeitia, 2018; Sanchez y Lareschi, 2019; Urdapilleta *et al.*, 2019; López Berrizbeitia *et al.*, 2020).

Como el resto de los parásitos, los sifonápteros no pueden completar su ciclo de vida sin asociarse, por lo menos en algún momento, con un hospedador. De este modo, utilizan como fuente de alimento a sus hospedadores y a través de estos se relacionan, total o parcialmente, con el medio externo (Marshall, 1981).

La co-evolución ha moldeado un alto porcentaje de las asociaciones entre las pulgas y sus hospedadores, ampliamente reflejado por la especificidad al hospedador y por las adaptaciones morfológicas que algunas pulgas han desarrollado para poder ajustarse a la morfología del pelaje, piel o plumas de su hospedador preferido. Asimismo, la amplitud de hospedadores que una especie de pulga puede abarcar, varía geográfica o temporalmente, indicando que esta condición de especificidad está fuertemente influenciada por condiciones ambientales locales (Krasnov *et al.*, 2004).

La biología de los sifonápteros no es homogénea (Medvedev y Krasnov, 2006). En un extremo están aquellos que solo se encuentran sobre el cuerpo del hospedador para alimentarse y/o copular durante un periodo de tiempo variable y, en el otro, están las especies que penetran en el tegumento del hospedador (por ejemplo, en el género *Tunga* Jarocki, 1838). También hay otros casos en los cuales las hembras se mantienen adheridas al tegumento del hospedador mediante su aparato bucal (por ejemplo, en el género *Hectopsylla* Frauenfeld, 1860). Además, las hembras grávidas de estos dos últimos grupos de sifonápteros presentan neosomía o expansión del abdomen (Rothschild, 1992). La diferencia entre las especies “penetrantes” y las “semipenetrantes” es que las primeras, cuando las hembras grávidas se fijan al tegumento de su hospedador, conforman un neosoma (hembra con neosomía + alteraciones en el hospedador), que es una estructura morfológica resultante de la secreción de una nueva

cutícula, con interés taxonómico, ya que, según las especies varía en forma, tamaño, presencia de lóbulos, invaginaciones y ubicación en el hospedador (Pampiglione *et al.*, 2009; Linardi y de Avelar, 2014). De acuerdo a Whiting *et al.* (2008) las especies con estilo de vida penetrante o semipenetrante muestran una mayor especificidad hospedatoria.

1.2 MORFOLOGÍA

Las pulgas morfológicamente son pequeñas, alcanzan alrededor de 1 a 8 mm de largo según la especie, no presentan alas, son aplanadas bilateralmente, con un exoesqueleto rico en quitina y con tres pares de patas (Fig.1). El último par de patas es de gran tamaño en relación al resto del cuerpo, ya que es el principal encargado de la función del salto, medio por el cual las pulgas se desplazan. Una gran variedad de especies y géneros de pulgas poseen uno o más ctenidios (o “peines”) en distintas partes del cuerpo. Además, tienen pequeñas setas que, junto con la disposición de los ctenidios, pueden reflejar características sobre el pelaje o las plumas del hospedador, ya que las pulgas utilizan estas estructuras para fijarse durante el acicalamiento o, por el contrario, desplazarse. En la región abdominal, poseen un importante órgano sensorial llamado pigidio, el cual les permite detectar el movimiento del aire, vibraciones y gradientes de temperatura, importantes en la elección de un hospedador (Linardi y Guimarães, 2000; Durden y Hinkle, 2019).

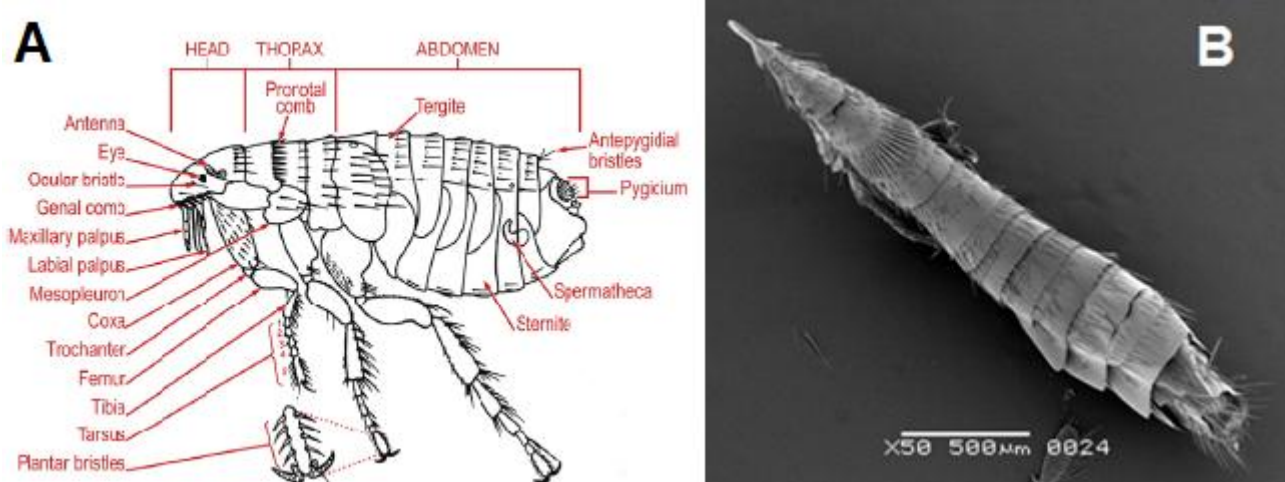


Figura 1. Estructura morfológica de las pulgas. (A) Ilustración representativa del plan corporal una pulga (Durden y Hinkle, 2019). (B) Imagen del cuerpo de una pulga, en vista dorsal, tomada desde un microscopio electrónico de barrido (MEB) (Foto: Juliana Sánchez).

Las piezas bucales de las pulgas están especializadas para perforar y succionar la sangre (Fig. 2). Dentro de estas estructuras, los palpos labiales son los encargados de localizar el sitio de alimentación, mientras que los estiletos, formados por dos lacinias maxilares ubicadas a los lados de la epifaringe, se encargan de perforar la piel del hospedador. La epifaringe conduce al esófago y luego al proventrículo, donde se unen el intestino anterior y el intestino medio. En la unión del intestino medio con el intestino posterior, surgen cuatro túbulos excretores de Malpighi (Durden y Hinkle, 2019).

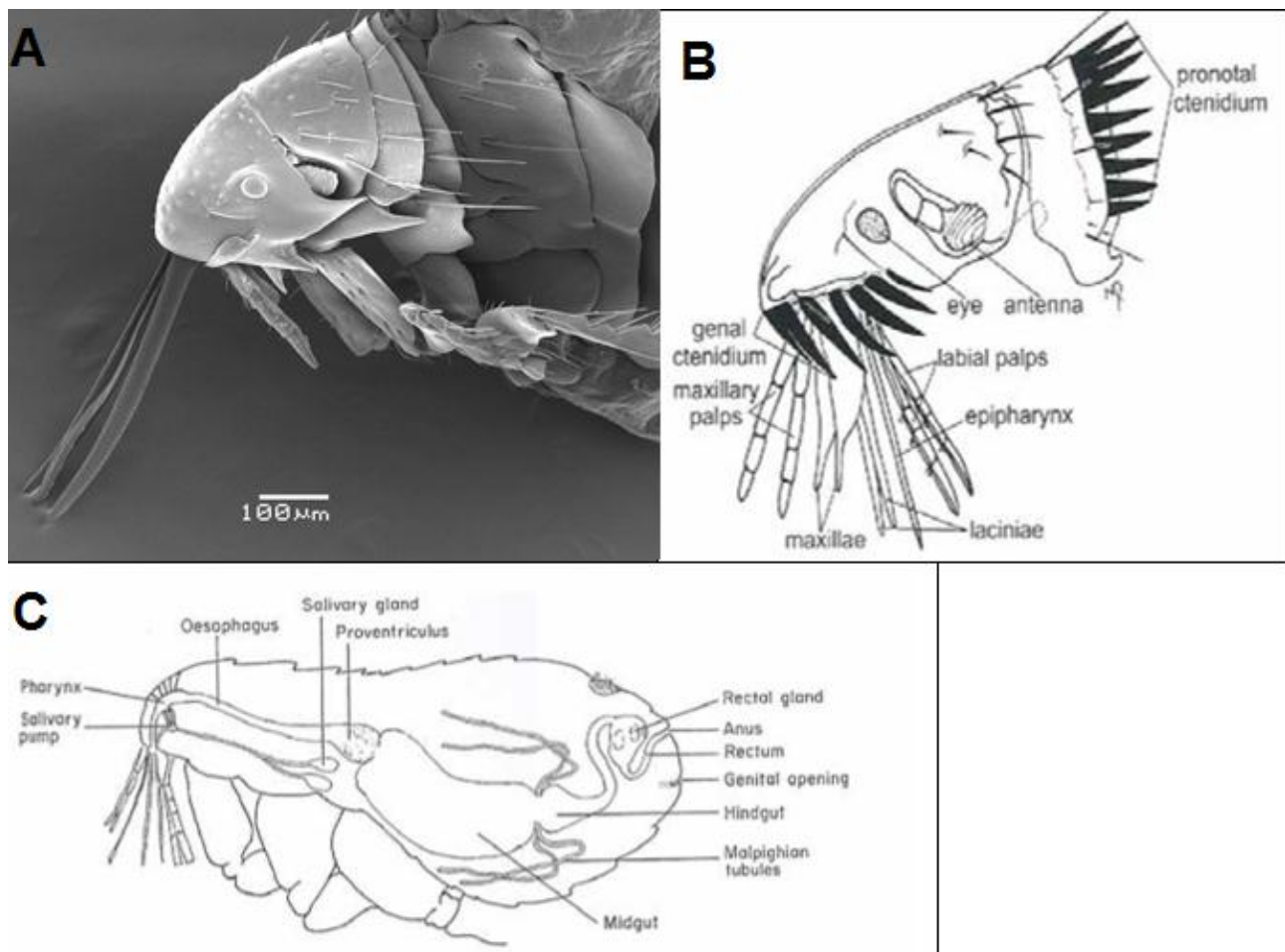


Figura 2. Piezas bucales de las pulgas. (A) Imagen de la cabeza tomada desde un microscopio electrónico de barrido (MEB) (Foto: Juliana Sánchez). (B) Ilustración de las piezas bucales. (C) Ilustración de la anatomía interna del canal alimenticio (Durden y Hinkle, 2019).

Las pulgas adultas presentan marcado dimorfismo sexual (Fig. 3) (Durden y Hinkle, 2019). Los últimos segmentos (tergitos y esternitos) del abdomen están modificados formando la genitalia. En el caso del macho, su genitalia es morfológicamente compleja ya que consta de una gran variedad de estructuras: los claspers, utilizados para asegurar

a la hembra durante el apareamiento, el aedeagus, a través del cual secretan el esperma, y las varillas del pene, que se insertan en la abertura femenina durante la cópula. Por otra parte, la genitalia de la hembra está constituida por: la vagina, el conducto espermático y la espermateca, en la cual se almacenan los espermatozoides después del apareamiento (Durdén y Hinkle, 2019).

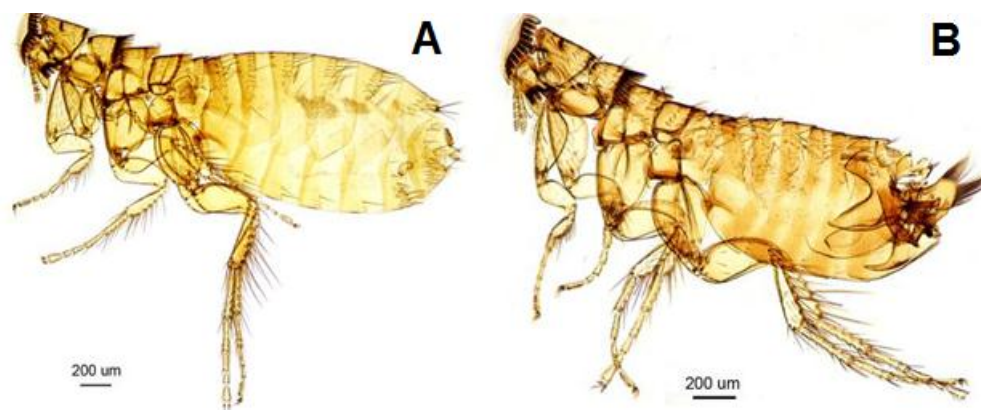


Figura 3. Dimorfismo sexual en pulgas *Plocopsylla* sp. visualizadas en microscopio óptico. (A) Hembra. (B) Macho (Foto: Juliana Sánchez).

1.3 CICLO BIOLÓGICO

Las pulgas son insectos holometábolos, por lo que su metamorfosis es completa y comprende las fases de huevo, larva, pupa e imago (Fig. 4). Solo durante el estadio adulto las pulgas son parásitas, mientras que el resto de los estadios transcurren principalmente en el suelo o madrigueras de los hospedadores (Marshall, 1981; Linardi y Guimarães, 2000).

Los huevos, pequeños, ovoides y de color blanco perlado, son pegajosos y pueden adherirse al pelaje del hospedador, aunque la mayoría de las veces es por un corto periodo de tiempo, ya que luego caen del hospedador. Las larvas son alargadas, sin patas ni ojos, y con gran cantidad de setas gruesas, sobre todo en los segmentos abdominales. Además, poseen una cápsula esclerotizada en la cabeza y glándulas mandibulares secretoras de seda, para construir el capullo que va a formar parte de la pupa. La mayoría de las larvas se alimentan de materia orgánica que encuentran en el hospedador y de

gránulos fecales ricos en sangre. Algunas complementan su dieta alimentándose de otras larvas o de artrópodos pequeños (Durden y Hinkle, 2019).

La etapa pupal generalmente dura entre una y dos semanas, pero está influenciada por la temperatura ambiente y la disponibilidad del hospedador. Las pulgas adultas de varias especies pueden permanecer dentro del capullo como adultos pre-emergentes hasta que el hospedador adecuado o las señales ambientales estimulen su aparición. La longevidad de las pulgas es mayor en ausencia de hospedadores disponibles a bajas temperaturas y alta humedad. En condiciones óptimas, las pulgas adultas de ciertas especies pueden sobrevivir lejos del hospedador durante más de un año (Durden y Hinkle, 2019).

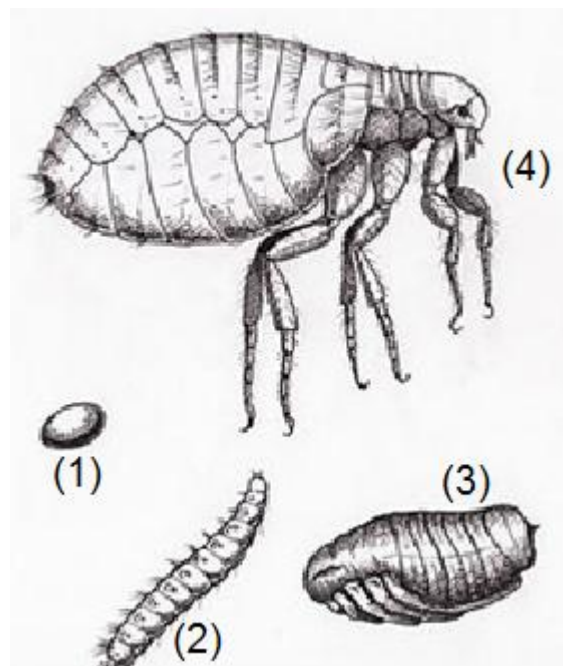


Figura 4. Ciclo biológico de las pulgas. Ilustración de (1) huevo, (2) larva, (3) pupa e (4) imago.

1.4 TAXONOMÍA

La mayoría de las características utilizadas para la identificación morfológica de las especies de pulgas se basan en la presencia y distribución de setas, espinas y ctenidios en el cuerpo, junto a la forma y estructura de sus genitales. Los machos de las pulgas tienen la genitalia más compleja del reino animal lo que la hace una estructura muy útil en

la identificación a nivel de especie y subespecie (Sánchez y Lareschi, 2014; Sánchez *et al.*, 2015).

Dentro de las 16 familias de pulgas reconocidas en la actualidad, Ctenophthalmidae es una de las más diversas, con un gran número de subfamilias y géneros en relación con el resto de las familias (Whiting *et al.*, 2008). En Argentina se distribuyen 13 especies, la mayoría del género *Neotyphloceras* Rothschild, 1914 (Lareschi *et al.*, 2016, López Berrizbeitia *et al.*, 2020). Este género en la actualidad incluye 7 especies y subespecies: *N. rosenbergi* (Rothschild, 1904); *N. crassispina crassispina* Rothschild, 1914; *N. crassispina hemisus* Jordan, 1936; *N. chilensis* nov. comb. Jordan, 1936; *N. crackensis* Sánchez y Lareschi, 2014, *N. pardinasi* Sánchez y Lareschi, 2014 y *N. boliviensis* Sánchez *et al.*, 2018.

1.5 DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y HOSPEDATORIA

Las pulgas se distribuyen a lo largo de todos los continentes en un amplio rango de hospedadores y hábitats (Krasnov, 2008) y, si bien son cosmopolitas, las distintas regiones geográficas se caracterizan por un número muy desigual de especies (Medvedev, 2000). Así, las estructuras de las comunidades de pulgas (riqueza específica, especies, abundancia y prevalencia) pueden variar con las distribuciones geográficas. Tales variaciones son generadas por interacciones entre los factores intrínsecos de las pulgas (especificidad hospedatoria, biología), factores del hospedador (tamaño corporal, inmunología, fisiología, rango geográfico) y características ambientales (temperatura, humedad, vegetación), limitando o favoreciendo el desarrollo y supervivencia de estos artrópodos (Marshall, 1981; Krasnov, 2008; Linardi y Krasnov, 2012).

Respecto de la distribución hospedatoria, la mayoría de las especies de pulgas se asocian con hospedadores mamíferos; dentro de estas el 74% se registran parasitando a roedores (Marshall, 1981; Whiting *et al.*, 2008). La riqueza de especies de pulgas asociadas al orden Rodentia ha sido la base para sugerir que estos insectos pueden haber co-evolucionado inicialmente con este grupo de mamíferos. En este sentido, el desplazamiento o asociación con otros mamíferos y aves, sería secundario (Marshall, 1981; Krasnov, 2008).

La afinidad hospedatoria de las pulgas varía desde sentido estricto a generalistas, y entre ellas, algunas especies de pulgas son específicas a nivel de taxones superiores de

sus hospedadores (como es el caso de las especies de las familias Vermipsyllidae con los hospedadores carnívoros e Ischnopsyllidae con murciélagos) (Krasnov, 2008; Whiting *et al.*, 2008). Según Poulin (2011), la amplitud del rango hospedatorio de un parásito puede estar limitada por las relaciones filogenéticas con las especies hospedadoras potenciales. De este modo, algunas especies de pulgas seguirán a sus hospedadores preferidos a lo largo de su distribución geográfica, mientras que otras se asociarán en mayor medida a las especies hospedadores que están disponibles en un ambiente o hábitat que les es propicio para su desarrollo y supervivencia (Sánchez, 2013).

1.6 DIVERSIDAD DE PULGAS EN LA PATAGONIA

En América del Sur, la mayor diversidad de pulgas en términos de familias, géneros y especies, se encuentra en Argentina. A su vez, la Patagonia (región Andina) presenta la mayor diversidad de pulgas, con más del 60% de especies y subespecies distribuidas, parasitando principalmente a roedores sigmodontinos. Le sigue la subregión de la Pampa (región Neotropical) en donde las especies de la subfamilia Rhopalosyllinae (Rhopalopsyllidae) son las dominantes (Lareschi *et al.*, 2016).

La fauna de pulgas de la Patagonia argentina está representada por 69 especies y subespecies (Beaucournu y del Carmen Castro, 2003; Hastriter y Sage, 2009, 2011; Sánchez *et al.*, 2009; Sánchez y Lareschi, 2013).

Sánchez y Lareschi (2019) sugieren que la humedad es el factor que más influye en la abundancia de pulgas en la Patagonia. Muchos de los ciclos biológicos en pulgas ocurren en el suelo, las condiciones abióticas como la temperatura, humedad relativa y precipitación afectan profundamente tanto a las etapas del imago como a las de pre-imago de las pulgas, especialmente en escala regional, lo cual resulta en una variación en su supervivencia y tiempos de desarrollo (Marshall, 1981; Krasnov, 2008; Linardi y Krasnov, 2012). Así, las áreas áridas como la Patagonia proveerían un hábitat más óptimo para Siphonaptera, favoreciendo su supervivencia y desarrollo.

Para la región patagónica la mayoría de los registros hospedatorios de sus especies de sifonápteros se refieren a roedores sigmodontinos (Cricetidae: Sigmodontinae) (Smit, 1987; Autino y Lareschi, 1998; Hastriter y Sage, 2011; Sánchez *et al.*, 2009; Sánchez y Lareschi, 2013). Esta distribución hospedatoria puede deberse a la correlación positiva existente entre la riqueza de especies y diversidad de pulgas y el

tamaño del rango geográfico hospedatorio. Debido a que los roedores son mamíferos distribuidos ampliamente, tienen mayores oportunidades de exposición a las pulgas, presentes en distintos ambientes (Krasnov, 2006).

Además, un elevado endemismo de pulgas y roedores ocurre en Patagonia (Pardiñas *et al.*, 2011; Lareschi *et al.*, 2016). Particularmente, en el caso de las pulgas, el endemismo es el resultado de largos procesos coevolutivos en este sistema parásito-hospedador.

1.7 PRINCIPALES HOSPEDADORES DE PULGAS: ROEDORES SIGMODONTINOS

De las 80 especies de mamíferos terrestres conocidas en la Patagonia, las más abundantes son los roedores cricétidos (Cricetidae, Sigmodontinae), representados por 17 géneros y unas 25 especies en estas tribus: Abrotrichini, Akodontini, Euneomyini, Oryzomyini, Phyllotini y Reithrodontini (Pardiñas *et al.*, 2015; Patton *et al.*, 2015).

Los roedores sigmodontinos constituyen el grupo de mamíferos vivientes más diverso a nivel de subfamilias. Su radiación adaptativa se traduce en unas 400 especies ubicadas en unos 82 géneros (Musser y Carleton, 2005). Ocupan una enorme variedad de nichos en los ecosistemas, desde una vida selvática hasta la dominancia en pastizales y estepas arbustivas, en los roquedales altoandinos y en los bañados templados y torrentes de altura. De este modo constituyen elementos fundamentales de cualquier asociación biótica (D'Elía, 2003; D'Elía y Pardiñas, 2007).

De acuerdo al ambiente en el que están adaptados, estos roedores tienen distintos tipos de locomoción tales como cursoriales (ej. *Akodon*), cavadores (ej. *Chelemys*), arbóreos (ej. *Rhipidomys*) y semiacuáticos de zonas palustres (ej. *Holochilus*). No existen formas estrictamente acuáticas ni planeadoras.

La mayoría de las especies de roedores sigmodontinos distribuidas en la Patagonia son miembros de las siguientes dos tribus: Abrotrichini y Phyllotini (Lessa *et al.*, 2012). De éstas, varios géneros de Abrotrichini son endémicos de la región y su estructura filogeográfica refuerza la idea de una historia de larga asociación con la Patagonia (Lessa *et al.*, 2010; Pardiñas *et al.*, 2011; Lessa *et al.*, 2012).

1.8 IMPORTANCIA SANITARIA DE LAS PULGAS PARÁSITAS DE ROEDORES

Las pulgas dependen energéticamente de sus hospedadores, limitando sus recursos y afectando en muchos casos la eficacia biológica del hospedador (Wobeser, 2009). Estos ectoparásitos al alimentarse pueden dañar los vasos sanguíneos, y algunas de ellas, pueden incluso llegar a causar dermatitis alérgica en sus hospedadores.

Las pulgas presentan una considerable importancia sanitaria, ya que pueden ser vectores de patógenos bacteriales y virales, de humanos y animales, que generan enfermedades zoonóticas como ser: la peste, el tifus murino, el tifus epidémico, la fiebre manchada y la enfermedad del arañazo de gato, entre otras (Durdén y Hinkle, 2019).

El reconocimiento de que las pulgas eran capaces de transmitir plagas (*Yersinia pestis*) y tifus murino (*Rickettsia typhi*) estimuló su estudio en los principios del siglo XX (Whiting *et al.*, 2003). La mayoría de las pulgas de importancia médica o veterinaria son miembros de la familia Pulicidae, tales como *Pulex irritans* Linnaeus, 1758, *Ctenocephalides felis* (Bouché, 1835) y *Xenopsylla cheopis* (Rothschild, 1903), como aquellas pertenecientes a las familias Tungidae, Ceratophyllidae, Leptopsyllidae o Vermipsyllidae. Ocasionalmente, los miembros de otras familias, en particular, Hystrichopsyllidae y Rhopalopsyllidae, también se alimentan de sangre de humanos y animales domésticos.

A nivel mundial, las infecciones transmitidas por pulgas están emergiendo o reemergiendo a lo largo de todo el mundo y, su incidencia, ha ido aumentando debido a que la distribución de estos ectoparásitos vectores está sufriendo cambios y una notable expansión. En ese sentido, aunque las pulgas sinantrópicas son las de mayor interés para la salud pública, el cambio climático y la invasión continua de los seres humanos en áreas naturales pueden proporcionar nuevas líneas de transmisión de poblaciones de patógenos desconocidas entre las pulgas “silvestres” (Bitam *et al.*, 2010; Eisen y Gage, 2012).

Dentro del sistema pulga-patógeno-reservorio, los roedores han mostrado ser el hospedador reservorio primario de varios patógenos que tienen significancia en la salud pública (Marshall, 1981; Linardi y Guimarães, 2000; Schneider *et al.* 2014).

En particular, en la Patagonia se encuentra la mayor diversidad de pulgas de roedores en América del Sur, con elevada prevalencia y abundancia parasitaria y baja especificidad hospedatoria en la mayoría de las pulgas estudiadas (Sánchez y Lareschi,

2019), esos resultados indican la necesidad de una mejor vigilancia de zoonosis potencialmente emergentes transmitidas por pulgas en la región patagónica.

En este sentido, el conocimiento sistemático de las pulgas, junto al de su distribución geográfica y hospedatoria, son fundamentales para el desarrollo de buenas estrategias de control de las ectoparasitosis que pueden provocar. En nuestro país son escasos los estudios que contemplan aspectos genéticos de las especies de pulgas y en este aspecto radica la importancia de la presente investigación.

1.9 MARCADORES MOLECULARES

La clasificación de los seres vivos requiere criterios de medida objetivos, por lo que es necesario comparar características comunes entre los organismos para determinar cuáles son más parecidos. La observación de los caracteres morfológicos externos fue históricamente la base conceptual de la taxonomía, por ser de observación inmediata (Igea de Castro, 2013). A mediados del siglo XX, con la formulación de la sistemática filogenética, propuesta por Willi Hennig (Hennig, 1966), que explicitaba los principios a seguir a la hora de elaborar las clasificaciones de los organismos, se establecía una distinción clara entre semejanza fenotípica y parentesco. Por otro lado, al mismo tiempo estaban teniendo lugar una serie de importantes descubrimientos que sentaban las bases de la biología molecular moderna, como el experimento Hershey-Chase (Hershey y Chase, 1952), que confirmó la naturaleza del ADN como material hereditario, como también la caracterización de la estructura de doble hélice del ADN de Watson y Crick (Watson y Crick, 1953). Todo esto impulsó la creación de una nueva corriente, encabezada por los bioquímicos Pauling y Zuckerkandl, que abogaba por el uso de los marcadores moleculares para realizar clasificaciones de los seres vivos. Según esta línea de pensamiento, los caracteres moleculares eran una evidencia del proceso evolutivo más clara o directa que los morfológicos y, eran compartidos por todos los seres vivos (Igea de Castro, 2013).

Un marcador molecular se define como una secuencia de nucleótidos correspondiente a una ubicación física particular en el genoma. Su secuencia debe ser polimórfica entre los individuos de una población y de carácter heredable, para que pueda rastrearse generación tras generación (Schulman, 2007). Los marcadores moleculares son una herramienta muy útil para el análisis directo e indirecto del DNA, permitiendo

visualizar la presencia de variantes alélicas, producto de algún tipo de cambio en la molécula de DNA en las poblaciones a través del tiempo evolutivo (Igea de Castro, 2013).

Los marcadores que identifican diferencias en el ADN pueden clasificarse en dos grupos, aquellos que identifican la variante en la secuencia de nucleótidos (polimorfismo de secuencia) y aquellos que identifican diferencias en el largo de la secuencia (polimorfismos de longitud). Dentro del primer grupo podemos citar como ejemplo a las sustituciones de nucleótidos simples (SNPs), polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs) y los marcadores mitocondriales y cloroplásticos; mientras que dentro de los segundos podemos mencionar a los microsatélites (STRs) y los polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) (Litt y Luty, 1989).

Por otra parte, los marcadores moleculares, de acuerdo a la región del genoma en la que se encuentren (codificante o no), o si corresponden al genoma nuclear o el citoplasmático, evolucionan a diferentes tasas y pueden ser sensibles o no a la acción de diversos procesos evolutivos, lo que limita su uso a la resolución de cierto tipo de problemas taxonómicos, filogenéticos y/o evolutivos (Fontdevila y Moya, 2007).

Para que los marcadores moleculares sean adecuados para estudios filogenéticos, tienen que tener su modo de evolución bien estudiado, de forma que se pueda modelar e incorporar a análisis (Igea de Castro, 2013). Tal es así el caso de los marcadores mitocondriales, los cuales son uno de los más empleados en los estudios de variabilidad genética y filogenias. Esto es así debido a que tienen un elevado número de copias de ADNmt en cada mitocondria y, por ende, en la célula, de herencia materna, su tasa de cambio molecular o mutación es elevada y no presentan recombinación (Igea de Castro, 2013). De los 73 genes mitocondriales, el de citocromo oxidasa I (COI) tiene dos ventajas importantes para el estudio filogenético. En primer lugar, los *primers* universales para este gen son muy robustos, lo que permite la amplificación a partir del extremo 5' en la mayoría de los phyla (Folmer *et al.*, 1994; Zhang y Hewitt, 1997). En segundo lugar, COI parece tener un mayor rango de señal filogenética que cualquier otro gen mitocondrial, como por ejemplo citocromo b. Este gen proporciona información filogenética más profunda que otras alternativas (Simmons y Weller, 2001), porque los cambios en su secuencia de aminoácidos ocurren más lentamente que aquellos en cualquier otro gen mitocondrial (Lynch y Jarrell, 1993).

Asimismo, el marcador COI es frecuentemente usado para evaluar la diversidad genética, especies crípticas y la estructura poblacional de invertebrados, a través de las diferencias de SNPs entre los organismos analizados (Brinkerhoff *et al.*, 2011; Scheffers *et al.*, 2012; Dantas-Torres *et al.*, 2013).

2. HIPÓTESIS

Existe variabilidad morfológica y genética para el gen Citocromo Oxidasa I (COI) en las pulgas del género *Neotyphloceras*, familia Ctenophthalmidae, en poblaciones hospedadoras de roedores sigmodontinos de la Patagonia Argentina.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Ampliar el conocimiento sobre las pulgas del género *Neotyphloceras* (Ctenophthalmidae) mediante la caracterización morfológica y molecular de especímenes asociados a poblaciones de roedores sigmodontinos (Sigmodontinae: Cricetidae) de la Patagonia Argentina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Recopilar información bibliográfica sobre la pulga del género *Neotyphloceras* y sus hospedadores, Sigmodontinae.
- Hallar características morfológicas distintivas para cada especie del género *Neotyphloceras* identificada, con el fin de evaluar si existen diferencias de dichas características entre poblaciones distribuidas en distintos hábitats de la región patagónica.
- Caracterizar genéticamente a las poblaciones del género *Neotyphloceras*, a partir del marcador mitocondrial COI.
- Determinar las relaciones filogenéticas a través del marcador mitocondrial COI en poblaciones del género *Neotyphloceras* en relación a su distribución geográfica.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDIO

El área de estudio se enmarca dentro de la región patagónica argentina. La Patagonia Argentina, localizada en el sudoeste de América del Sur, es el área con mayor superficie del territorio argentino (Rabassa, 2008). Biogeográficamente, la Patagonia representa las condiciones ambientales de la subregión patagónica de la región Andina (Morrone, 2006). Esta área puede definirse como una región templada o frío-templada. La heterogeneidad climática del territorio resulta de la combinación del gradiente latitudinal de temperatura y del gradiente de precipitaciones oeste-este. La predominancia del viento oeste es también característica del clima patagónico (Paruelo *et al.*, 1998).

La Patagonia comprende distintas ecorregiones, entre las que se encuentran la región Monte, comprendida por el Monte de Llanuras y Mesetas, y la Estepa Patagónica, dividida en este estudio en Estepa árida y húmeda (Burkart *et al.*, 1999).

La ecorregión Monte comprende un clima árido-templado, precipitaciones que rondan los 100 mm anuales, un promedio anual de temperaturas de entre 10 y 14 °C, frecuente salinidad del suelo y pedregosidad. La fisionomía de la flora es homogénea y se caracteriza por una baja cobertura de estepa de matorrales. La región Estepa Árida tiene un promedio anual de temperatura de entre 8 y 13°C y un promedio anual de precipitaciones de entre 150 y 200 mm. Su vegetación se caracteriza por una elevada estepa de matorrales y cobertura de estepas arbustivas. La región de Estepa Húmeda tiene un clima más frío y lluvioso que el resto de las ecorregiones mencionadas antes. El promedio anual de temperaturas es por debajo de los 7°C. Tiene alrededor de 600 mm de precipitaciones anuales, principalmente en forma de nieve. Físicamente homogénea, se caracteriza por una estepa arbustiva con alta cobertura y pocos arbustos. En el sector este, en donde las precipitaciones son mayores, los bosques deciduos de *Nothofagus* entran en el terreno de ecotono ventoso (León *et al.*, 1998).

4.2 COLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las pulgas fueron colectadas en localidades de la Patagonia argentina (Fig. 5), examinando la piel y pelaje en determinadas zonas del cuerpo de los roedores

sigmodontinos, utilizando peines, fórceps y pinzas, según la metodología descrita por Sánchez (2013). Las pulgas colectadas de cada individuo hospedador fueron colocadas en un tubo 1,5 ml *Eppendorf* con alcohol 96% para su conservación, y posterior identificación y análisis molecular.

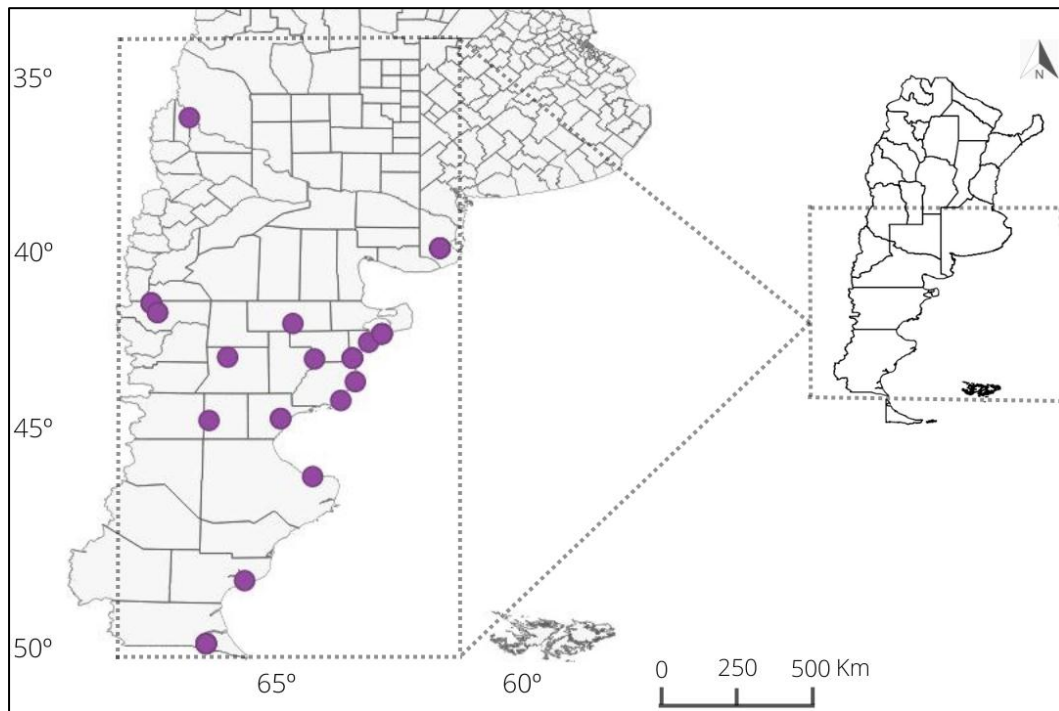


Figura 5. Sitios de muestreo de ectoparásitos del género *Neotyphloceras* en la Patagonia Argentina (provincias de Neuquén, Río Negro, Chubut y Santa Cruz).

4.3. TRATAMIENTO E IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA A PARTIR DE LA MORFOLOGÍA DE LAS PULGAS

Para la identificación preliminar del género de las pulgas se estudió su morfología, utilizando microscopio óptico y estereoscópico, y las claves y descripciones originales (Sánchez *et al.*, 2012; Sánchez y Lareschi, 2014). La identificación a nivel específico, en la mayoría de los ejemplares, se realizó luego de la extracción de ADN. Para esto, las pulgas fueron aclaradas en hidróxido de Potasio (KOH) diluido al 10%, deshidratadas en una serie creciente de alcoholes (80°, 90° y alcohol absoluto), diafanizadas en eugenol y montadas en un portaobjetos con bálsamo de Canadá para obtener un preparado permanente. Posteriormente se observaron minuciosamente características de la genitalia y segmentos modificados del abdomen, tanto de machos como de hembras.

4.4. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

Se extrajo el ADN genómico de cada ejemplar de *Neotyphloceras* spp. mediante el protocolo de resina Chelex-100 (Bio Rad, Estados Unidos) modificado (Anexo 1). Esta técnica permite extraer ADN manteniendo prácticamente intacta la morfología de la pulga, posibilitando así su posterior estudio morfológico. En las muestras en las que no se pudo extraer ADN mediante este protocolo, se procedió a la limpieza de las mismas mediante 3 lavados con alcohol 70° frío y resuspendido en 20 µl de *buffer* TE 1X. Este paso se hizo para eliminar residuos de la resina Chelex ya que investigaciones previas (García García *et al.*, 2008) indican que ésta podría inhibir la reacción de PCR.

En aquellas muestras en las que aún con la limpieza realizada la PCR no arrojó resultados positivos, se procedió a la extracción mediante CTAB modificado (Anexo 2), en el cual se realiza una trituración total del ectoparásito (Doyle y Doyle, 1987).

4.5 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) PARA EL MARCADOR MOLECULAR CITOCROMO OXIDASA I

Se amplificó mediante PCR un fragmento de 453 pb correspondiente al gen COI mediante los *primers forward* Kmt6 5'-GGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCC-3' y *reverse* HC02198 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' (Zhu *et al.*, 2015).

Las amplificaciones por PCR se realizaron en un volumen final de 25 µl, conteniendo entre 25 y 100 ng de ADN molde, 2,5 µl mM de MgCl₂, 0,35 µl de *primer forward*, 0,35 µl de *primer reverse*, 0,5 µl de dNTPs, *buffer* de reacción 1X 2.5µl, 0,5 U de Pegasus DNA polimerasa y agua estéril ultrapura para llevar a volumen final. El programa de PCR contó con un paso de desnaturalización inicial a 96°C por 2 minutos, seguido por 40 ciclos a 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto, terminando con una extensión a 72°C por 7 minutos. En todas las amplificaciones se empleó un control negativo (agua destilada). Todas las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador Gene Pro (BIOER).

El resultado de la amplificación se verificó en un gel de agarosa 1% m/v teñido con bromuro de etidio y observado bajo luz ultravioleta. Como parámetro del tamaño de los fragmentos se utilizó un marcador de peso molecular *qLadder 100 bp precision* (PB-L, Argentina). Las muestras se sembraron junto con el *buffer* de siembra DNA Dye (EZ-

VisionThree, Amresco, Estados Unidos) con la finalidad de poder divisar el frente de corrida.

Luego se cuantificó el ADN amplificado, tomando fotografías de alta resolución de los geles obtenidos a través del *software* GeneSys V1.4.6.0 (Syngene, India), para ser analizados posteriormente con el programa informático ImageJ (Abràmoff, 2004).

Los productos que tuvieron una concentración mayor a 20 ng/μl fueron enviados a la empresa Macrogen (Corea) para su purificación y posterior secuenciación estándar.

4.6 SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS DATOS

Cada secuencia se visualizó y editó con el programa BioEdit (Hall, 2004).

El número de haplotipos, como los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica fueron calculados con el *software* DNAsp (Librado y Rozas, 2009).

Las relaciones entre los haplotipos y los haplotipos por sitios de muestreo fueron determinados mediante el algoritmo *Median Joining* a través del *software* PopArt (Bandelt *et al.*, 1999; Leigh y Bryant, 2015). Adicionalmente, se utilizó a modo comparativo la única secuencia de *Neotyphloceras* reportada hasta el momento de *GenBank*: *Neotyphloceras crassispina* ssp. (N° Acceso *GenBank*: KM890944).

Se realizaron estudios filogenéticos mediante las inferencias Máxima Verosimilitud (MV) y *Neighbor Joining* (NJ), a través del programa MEGA v.11 (Drummond *et al.*, 2012; Tamura *et al.*, 2013) bajo el modelo Tamura-Nei, empleando las opciones recomendadas por el programa. La determinación de los límites de confianza para monofilia de cada nodo se realizó a través de un análisis de *bootstrap* con 1000 réplicas (Felsenstein, 1985). Para esto se emplearon adicionalmente N=34 secuencias de distintas especies de pulgas y N=2 de *Rattus rattus* obtenidas de *GenBank* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Se eligieron las secuencias de *Rattus rattus* como *outgroup* ya que al considerar secuencias de otros artrópodos, las mismas no enraizaron los árboles.

Por último, para validar el marcador molecular COI con las inferencias filogenéticas NJ y MV para este grupo taxonómico, se realizaron 4 árboles adicionales para un fragmento de 415 pb (N=34) y para otro de 635 pb (N=27) para el conjunto de datos tomado de *GenBank*.

5. RESULTADOS

Se identificaron 58 ejemplares de *Neotyphloceras* spp., siguiendo las características morfológicas enmarcadas en la tabla 1, que recopila la información existente para las descripciones y redescripciones de todas las especies y subespecies del género. De los 58, 40 fueron utilizadas para el estudio morfológico que permitió su identificación a nivel específico.

5.1. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

Los ejemplares fueron identificados morfológicamente como *N. crackensis* (n=29) y *N. pardinasi* (n=11). A continuación, se proporciona un resumen taxonómico de cada especie y se especifican la procedencia geográfica, hospedadores, el número y sexo de cada individuo estudiado, con su respectivo acrónimo:

NEOTYPHLOCERAS CRACKENSIS SANCHEZ Y LARESCHI, 2014

MATERIAL ESTUDIADO (6 MACHOS; 23 HEMBRAS): Río Negro: Viedma (40°27'55"S, 62°47'55" O; 12m s.n.m): ex *G. griseoflavus*, 3 hembras (MW13-JS7; MW106-JS16; MW99-JS19); 1 macho (MW112-JS22). Chubut: Bahía Cracker (42°57'02''S, 64°28'45''O; 7m s.n.m.): ex *G. griseoflavus*, 3 hembras (DUS 490-JS8; DUS 494-JS9; DUS 487-JS31), 1 macho (DUS 494-1); ex *E. typus*, 1 hembra (DUS 481-JS18); Bajo los Huesos (43°11'42", 64°51'52"; 12m s.n.m.): *G. griseoflavus*, 1 hembra (DUS 497-JS21); Isla Escondida (43°39'18''S, 65°20'05''O; 30m s.n.m): ex *E. typus*, 1 hembra (DUS 521-JS1); ex *G. griseoflavus*, 1 hembra (DUS 529-JS6); ex *A. iniscatus*, 1 hembra (DUS 548-JS17); Los Nogales (42°39'05''S, 67°03'37''O; 210m s.n.m): ex *G. griseoflavus*, 1 hembra (DUS 762-JS4); Puerto Piojo (44°53'00''S, 65°40'19''O; 6m s.n.m): ex *E. typus*, 1 hembra (DUS 653-JS5); Cabo Raso (44°20'23''S, 65°14'59''O; 4m s.n.m): ex *A. iniscatus*, 1 hembra (DUS 563-JS28); Pico Salamanca (45°24'32''S, 67°24'58''O; 900m s.n.m): ex *R. auritus*, 2 hembras (DUS 696-JS13; DUS 705-JS15); 1 macho (DUS 696); Caolineria Dique Ameghino (43°40'48" S, 66°25'57" W, 190 m s.n.m): ex *P. xanthopygus*, 1 hembra (DUS 401-JS23); Alm. Hotel Los Manantiales, Río Senger (45°27'51"S, 69°29'25"O; 619m s.n.m): ex *A. hirta*, 1 macho (PPA 942-JS3). Santa Cruz: Ea. La Madrugada, frente al faro de Mte.

Loayza (47°05'24.6"S, 66°29'16"O; 142m s.n.m.): ex *E. typus*, 1 hembra (PPA 1082-JS2); Puerto Santa Cruz (51°56'09" S, 69°34'26" O; 5 m. s.n.m.): ex *A. olivacea*, 4 hembras (LTU 642-JS11; LTU 660-JS12; LTU 643-JS14; LTU 650-JS25); Pali Aike (50°06'30" S, 68°27'37" O;): ex *A. olivacea*, 1 hembra (LTU 669-JS20), 3 machos (LTU662, LTU674, LTU675).

INFORMACIÓN TAXONÓMICA

HOSPEDADOR TIPO: *Graomys griseoflavus* Waterhouse, 1837.

LOCALIDAD TIPO: Bahía Cracker (42°57'20"S, 64°28'45"O, 5 m s.n.m.), Chubut, Argentina.

OTROS HOSPEDADORES CONOCIDOS: Mammalia- Rodentia- Cricetidae: *Abrothrix olivacea*, *Akodon iniscatus*, *Eligmodontia morgani*, *Eligmodontia typus*, *Phyllotis xanthopygus*, *Reithrodon auritus* (Sanchez y Lareschi, 2019).

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA CONOCIDA: Argentina- Chubut: Bajo Los Huesos, Cabo Raso, Los Nogales, Pico Salamanca, Puerto Piojo. Santa Cruz: Pali Aike (Sanchez y Lareschi, 2019).

COMENTARIOS: Los machos estudiados reúnen las siguientes características, son similares a *N. crackensis* y *N. chilensis* en la localización de la última seta del proceso fijo del clasper (Figs.8, D y E) y en la suave concavidad del ápice del brazo distal del esternito IX (Figs.9, D y E), pero coinciden solo con *N. crackensis* en la forma general y quetotaxia del brazo distal del esternito IX (Fig.9, E) y en la forma del crochet del aedeagus (Fig.10, E). Las hembras identificadas como *N. crackensis* poseen el contorno del margen distal del esternito VII con un conspicuo lóbulo en el centro (Fig.11, E).

Respecto de la distribución de *N. crackensis*, estos resultados amplían su distribución geográfica conocida, ya que es la primera mención en las siguientes localidades de tres provincias patagónicas: Viedma (Río Negro), Dique Ameghino y Río Senger (Chubut) y Ea. La Madrugada, Mte. Loayza y Puerto Santa Cruz (Santa Cruz).

***NEOTYPHLOCERAS PARDINASII* SANCHEZ Y LARESCHI, 2014**

MATERIAL ESTUDIADO (5 MACHOS; 6 HEMBRAS): Chubut: Cañadón de la Madera, Sierra de Tepuel (43°51'55"S, 70°43'34"W, 1039 m s.n.m.): ex *A. hirta*, 1 macho (PPA5-1); 1

hembra (PPA-2); Ea. El Maitén (42°03'34"S, 71°09'48"O; 1190m s.n.m): ex *A. hirta*, 2 hembras (LTU 509-JS26; LTU 508- JS27), 2 machos (LTU 507; LTU 508); ex *A. olivacea*, 1 hembra (DUS 184- JS32); Ea. Leleque (42°19'56"S, 70°59'00"O; 613m s.n.m): ex *A. hirta*, 1 hembra (DUS 143- JS29); 2 machos (DUS 143); ex *L. micropus*, 1 hembra (DUS 145- JS33).

INFORMACIÓN TAXONÓMICA

HOSPEDADOR TIPO: *Abrothrix hirta* (Waterhouse, 1837)

LOCALIDAD TIPO: Cañadón de la Madera, Sierra de Tepuel, provincia del Chubut (43°51'55"S, 70°43'34"W, 1039 m s.n.m.).

OTROS HOSPEDADORES CONOCIDOS: Mammalia- Rodentia- Cricetidae: *Abrothrix olivacea*, *Chelemys macronyx*, *Eligmodontia morgani*, *Euneomys chinchilloides*, *Loxodontomys micropus*, *Phyllotis xanthopygus* (Sanchez y Lareschi, 2019).

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA CONOCIDA: Argentina- Chubut: Estancia El Maitén, Estancia Leleque (Sanchez y Lareschi, 2019).

COMENTARIOS: Los machos identificados en este estudio son similares a *N. pardinasi*, *N. crassispina crassispina* y *N. crassispina hemisus* en la localización de la última seta del proceso fijo del cláster (Figs.8, C, F, G) y por la concavidad del brazo distal esternito IX (Figs.9, C y F), pero coinciden solo con *N. pardinasi* en la quetotaxia y forma de las setas del brazo distal del esternito IX (Fig.9, C) y en la forma del ápice del crochet del aedeagus (Fig.10, C). Las hembras identificadas como *N. pardinasi* poseen un esternito VII ancho con el contorno del margen distal fuertemente convexo en la porción final (Fig.11, C). Los ejemplares identificados morfológicamente como *N. pardinasi* siguen la distribución geográfica y hospedatoria conocida (Sánchez y Lareschi, 2014; 2019; Lareschi *et al.*, 2016).

Tabla 1. Características diagnósticas de las especies y subespecies del género *Neotyphloceras* Rothschild, 1914. Proceso fijo del cláspes (P). Brazo distal del esternito IX (DAIX). Esternito IX (DAIX). Crochet (CR). Aedeagus (AE). VII (STVII).

CARACTERÍSTICAS	<i>NEOTYPHLOCERAS</i> <i>ROSENBERGI</i> FIGS. 6A, A-B	<i>NEOTYPHLOCERAS</i> <i>BOLIVIENSIS</i> FIGS. 6A, C-D	<i>NEOTYPHLOCERAS</i> <i>PARDINASII</i> FIGS. 6A, E-F	<i>NEOTYPHLOCERAS</i> <i>CHILENSIS</i> FIGS. 6B, G-H	<i>NEOTYPHLOCERAS</i> <i>CRACKENSIS</i> FIGS. 6B, I-J	<i>NEOTYPHLOCERAS</i> <i>CRASSISPINA</i> SSP. FIGS. 6B, K-L
FORMA DE LA FRENTE O CABEZA (FIGS.7, A-F)	Frente redondeada, cuatro veces más larga que alta (Fig.7, A)	Frente angulosa, dos veces más larga que alta en el punto extremo del ángulo (Fig.7, B)	Frente redondeada, cuatro veces más larga que alta (Fig.7, C)	Frente redondeada, cuatro veces más larga que alta (Fig.7, D)	Frente redondeada, cuatro veces más larga que alta (Fig.7, E)	Frente redondeada, cuatro veces más larga que alta (Fig.7, F)
QUETOTAXIA Y UBICACIÓN DE LAS FILAS DE SETAS FRONTALES (FIGS.7, A-F)	2 filas de setas frontales situadas delante del borde pre-oral; 1° fila con 8 o 9 setas equidistantes (Fig.7, A).	2 filas de setas frontales situadas por encima o detrás del margen pre-oral; 1° fila con 7 setas equidistantes (Fig.7, B).	2 filas de setas frontales situadas por encima o por detrás del margen pre-oral; 1° fila con 7 setas equidistantes (Fig.7, C).	2 filas de setas frontales situadas por encima o por detrás del margen pre-oral; 1° fila con 7 setas equidistantes (Fig.7, D)	2 filas de setas frontales situadas por encima o por detrás del margen pre-oral; 1° fila con 6 o 7 setas equidistantes (Fig.7, E).	Dos filas de setas frontales situadas por encima o por detrás del margen pre-oral; 1° fila con 7 setas equidistantes (Fig.7, F).
SPINELETS ABDOMINALES	Presentes en tergitos II y III (Figs.6a, A-B)	Presentes en tergitos II–V (Fig.6a ,C-D)	Ausentes	Ausentes	Ausentes	Presentes en <i>N. crassispina hemisus</i> (Figs. 6b, K-L)
LONGITUD DE LAS SETAS ANTERIORES AL SENSILIO	Una más corta que la otra (Figs. 6a, A-B)	Las dos de largo similar (Figs.6a, C-D)	Las dos de largo similar (Figs.6a, E-F).	Las dos de largo similar (Figs.6b, G-H)	Las dos de largo similar (Figs.6b, I-J).	Las dos de largo similar (Figs.6b, K-L).
MACHOS						
PIGMENTACIÓN DE LA SETA APICAL DEL PROCESO MÓVIL DEL	Suavemente pigmentada (Fig.8, A)	Oscura (Fig.8, B)	Oscura (Fig.8, C).	Oscura (Figs.8, D)	Oscura (Figs.8, E).	Oscura (Figs.8, F, G).

CLÁSPER (F)						
LARGO DEL PROCESO FIJO DEL CLÁSPER (P)	Corto (Fig.8, A)	Dos veces más largo que ancho (Fig.8, B)	Dos veces más largo que ancho (Figs.8, C).	Alargado (Fig.8, D)	Alargado (Fig.8, E).	Dos veces más largo que ancho (Figs.8, F, G).
LOCALIZACIÓN DE LA SETA MÁS DISTAL DEL PROCESO FIJO DEL CLÁSPER	Muy cerca de la punta (Fig.8, A)	Desplazada de la punta por una distancia igual al ancho del proceso fijo del clasper en el punto de inserción de la seta (Fig.8, B).	Desplazada de la punta por una distancia igual al ancho del proceso fijo del clasper en el punto de inserción de la seta (Fig.8, C).	Desplazada de la punta por una distancia cercana al doble del ancho del proceso fijo del clasper en el punto de inserción de la seta (Fig.8, D.)	Desplazada de la punta por una distancia cercana al doble del ancho del proceso fijo del clasper en el punto de inserción de la seta (Fig.8, E)	Desplazada de la punta por una distancia igual al ancho del proceso fijo del clasper en el punto de inserción de la seta (Fig.8, F) En la punta en <i>N. c. crassispina</i> (Fig.8, G)
ÁNGULO ENTRE EL MARGEN DISTAL Y PROXIMAL DEL PROCESO FIJO DEL CLÁSPER	Formando un triángulo equilátero (Fig.8, A)	Formando un ángulo 45° y 60° (Fig.8, B).	Formando un ángulo 45° y 60° (Fig.8, C).	Formando un ángulo <45° (Fig.8, D)	Formando un ángulo <45° (Fig.8, E)	Formando un ángulo 45°-60° (Figs.8, F, G)
FORMA DEL ÁPICE DEL PROCESO FIJO DEL CLÁSPER	Recto (Fig.8, A)	Dirigido hacia abajo (Figs.8, B).	Dirigido levemente hacia abajo (Fig.8, C).	Dirigida hacia arriba (Fig.8, D)	Recto (Fig.8, E).	Casi recto en <i>N. c. crassispina</i> . (Fig.8, G) Dirigido hacia abajo levemente (Fig.8, G)
MARGEN DORSAL DEL ÁPICE DEL BRAZO DISTAL DEL ESTERNITO IX (DAIX)	Convexo (Fig.9, A)	Marcadamente cóncavo (Fig.9, B)	Marcadamente cóncavo (Fig.9, C)	Suavemente cóncavo (Fig.9, D)	Suavemente cóncavo (Fig.9, E).	Marcadamente cóncavo (Fig.9, F)
QUETOTAXIA DEL MARGEN VENTRAL DEL BRAZO DISTAL DEL ESTERNITO IX (DAIX)	3 setas en forma de espinas curvadas y alineadas cerca del ápice (Fig.9, A)	3 setas anchas fuertemente pigmentadas, cerca del ápice, una por encima de las otras y 4 setas delgadas	6 setas en forma de espinas, curvadas y alineadas. La primera más ancha y fuertemente pigmentada	5 setas en forma de espina, la primera más ancha, fuertemente pigmentada y se ubica arriba de las otras en el centro	5-6 setas en forma de espina, curvadas y alineadas. La primera más ancha y fuertemente pigmentada (Fig.9,	6 setas en forma de espina, curvadas y alineadas. La primera más ancha y fuertemente pigmentada (Fig.9,

		ligeramente pigmentadas, ubicadas en una fila ventral (Fig. 9, B)	(Fig.9, C)	(Fig.9, D)	E).	F)
FORMA DEL ÁPICE DEL CROCHET (CR) DEL AEDEAGUS (AE)	Margen proximal recto y margen distal en punta (Fig.10,A)	Forma de martillo (Fig.10,B)	Margen proximal con una proyección angulosa y margen distal casi recto (Fig.10, C)	Margen proximal con una proyección redondeada y margen distal fuertemente convexa (Fig.10, D)	Margen proximal con 2 proyecciones angulares alineadas una debajo de la otra y margen distal casi recto o suavemente cóncavo (Fig.10, E).	Margen proximal con una proyección angulosa y margen distal casi recto (Fig.10, F).

Continuación tabla 2

HEMBRAS						
FORMA DEL ESTERNITO VII (STVII)	Margen distal convexo en el tercio final de la longitud total; Ápice redondeado fuertemente, mitad de estrecho que la base del esternito (Fig.11, A).	Margen distal convexo en la mitad inferior, con una pequeña muesca en la esquina inferior (Fig.11, B).	Con un lóbulo levemente desarrollado en el centro (Fig.11, C)	Casi recto (Fig.11, D).	Con un lóbulo convexo bien desarrollado en el centro (Fig.11, E).	Ligeramente convexo en la parte inferior del margen distal (Fig.11, F).
QUETOTAXIA DEL ESTERNITO VII	4 setas (Fig.11, A).	5 o 6 setas (Fig.11, B).	5 o 6 setas (Fig.11, C).	5 setas (Fig.11, D).	5 o 6 setas (Fig.11, E).	5 setas (Fig.11, F).
REFERENCIAS	Rothschild, 1904; Sanchez <i>et al.</i> , 2018	Sanchez <i>et al.</i> , 2018	Sanchez y Lareschi, 2014	Sanchez <i>et al.</i> , 2012	Sanchez y Lareschi, 2014	López Berrizbeitia <i>et al.</i> , 2015;

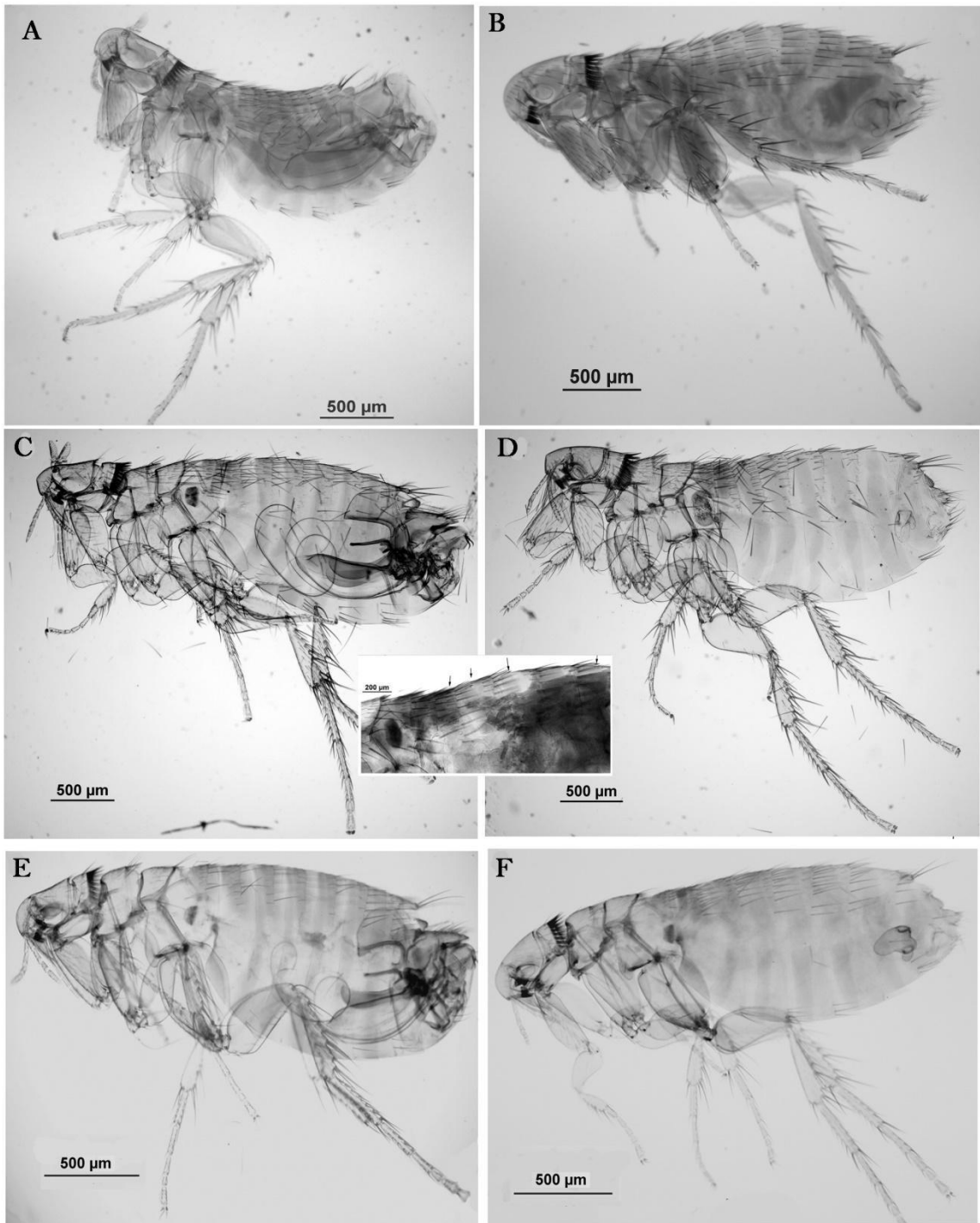


Figura 6a. Características generales de machos y hembras de las especies y subespecies de *Neotyphloceras*. (A-B) *Neotyphloceras rosenbergi*. (C-D) *Neotyphloceras boliviensis*. (E-F) *Neotyphloceras pardinasi*.

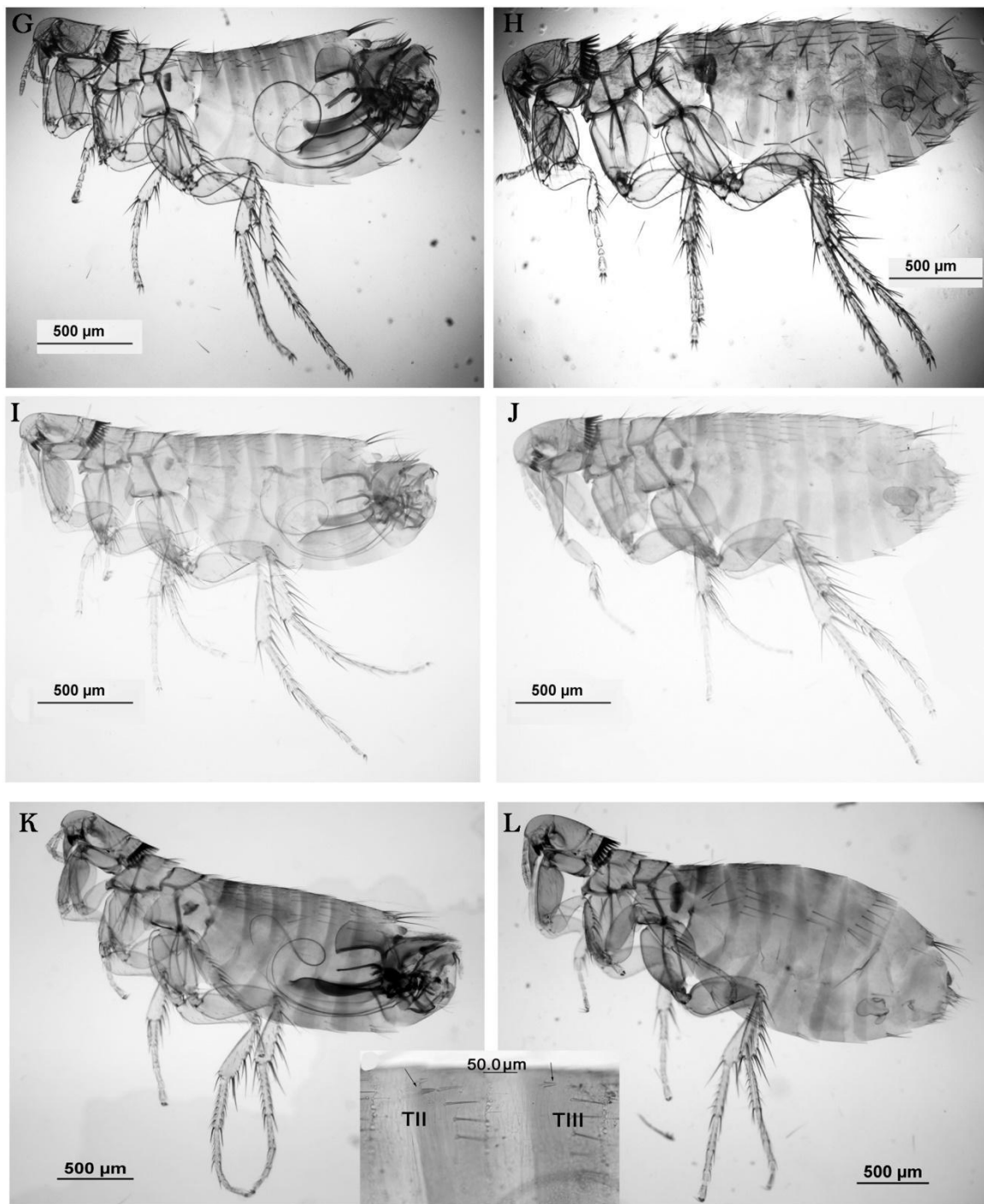


Figura 6b. Características generales de machos y hembras de las especies y subespecies de *Neotyphloceras*. (G-H) *Neotyphloceras chilensis*. (I-J) *Neotyphloceras crackensis* (K-L) *Neotyphloceras crassispina* ssp.

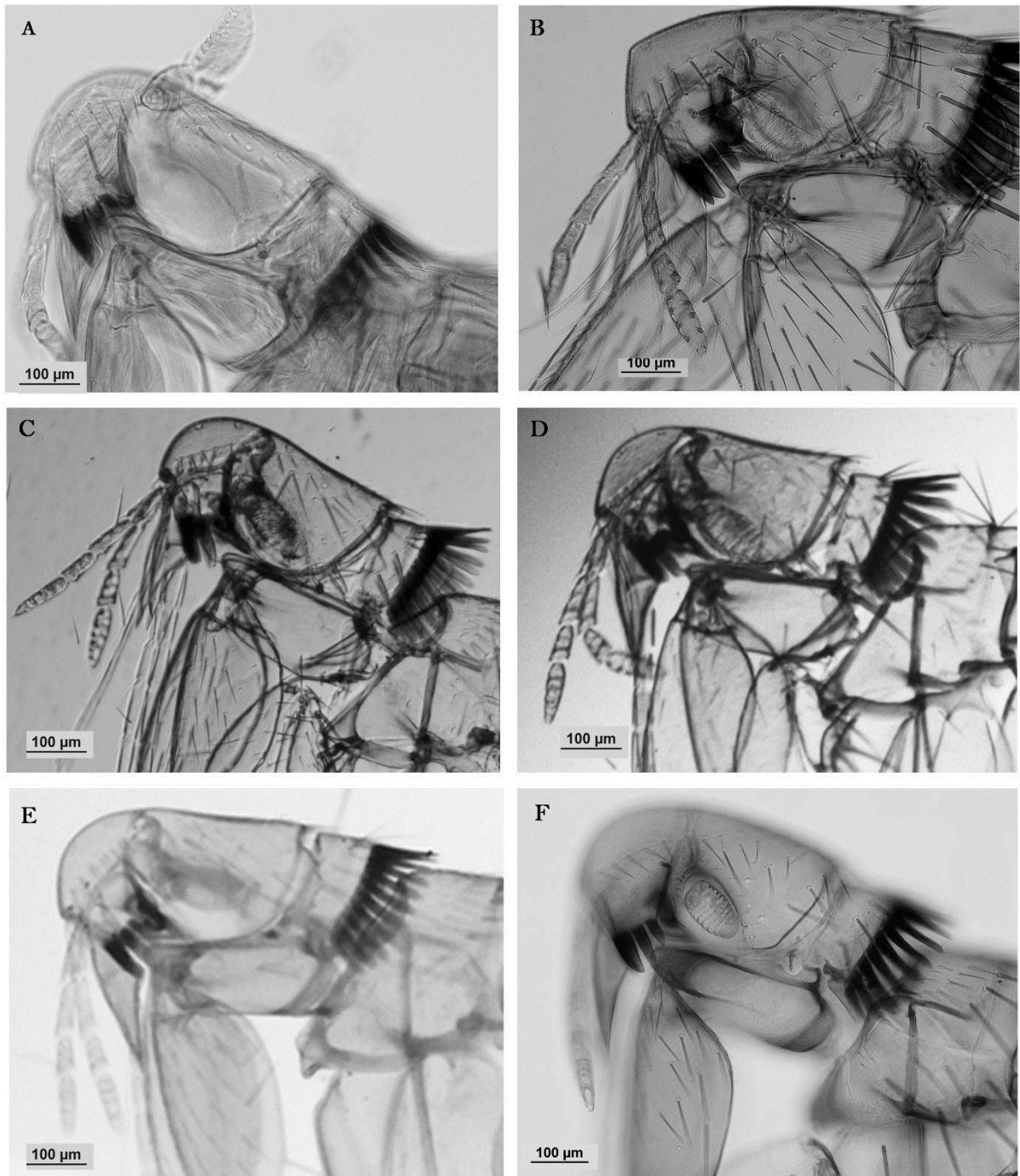


Figura 7. Características de la morfología de la cabeza de las especies de *Neotyphloceras*. (A) *Neotyphloceras rosenbergi*. (B) *Neotyphloceras boliviensis*. (C) *Neotyphloceras pardinasi*. (D) *Neotyphloceras chilensis*. (E) *Neotyphloceras crackensis*. (F) *Neotyphloceras crassispina* ssp.

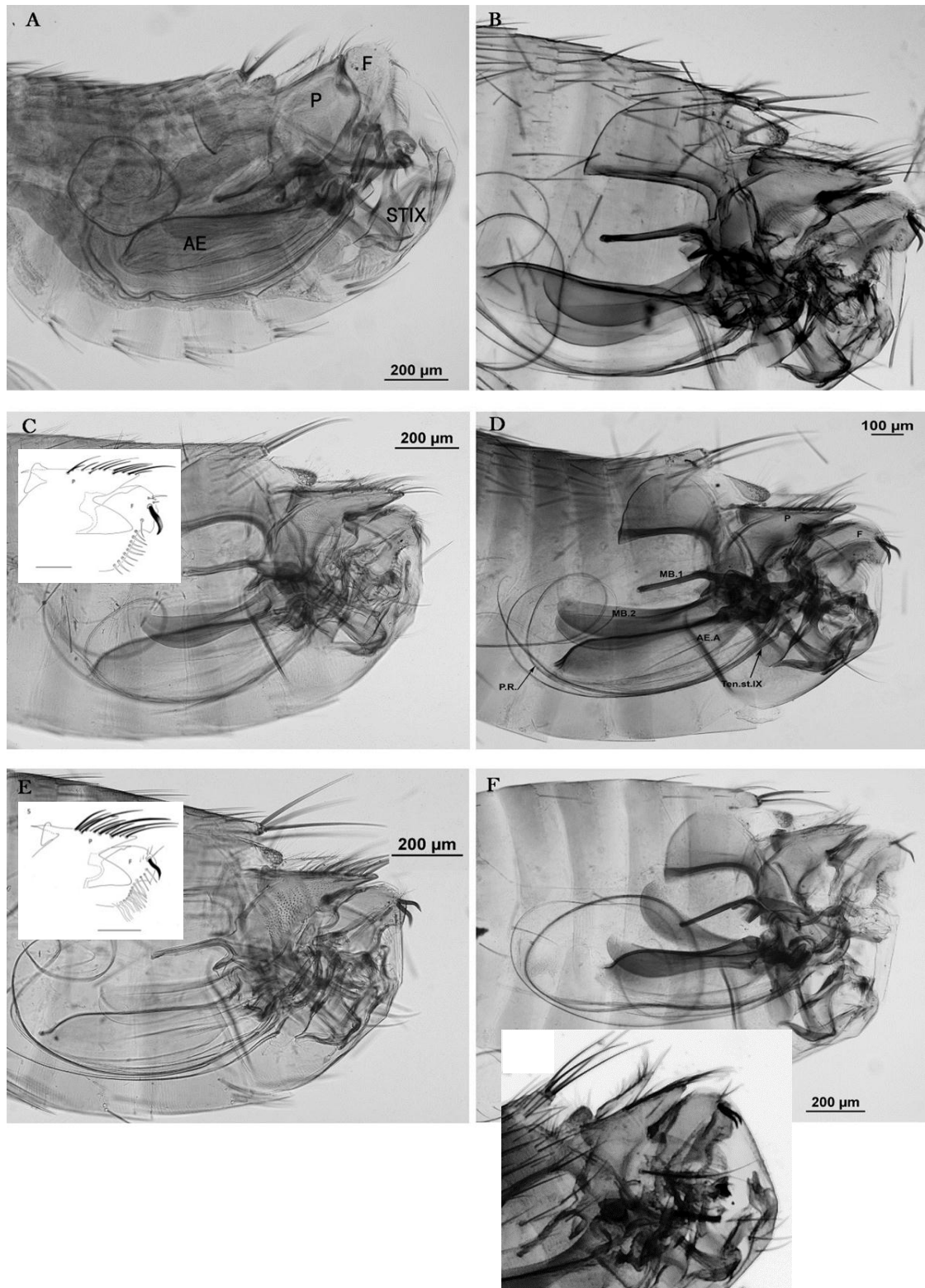


Figura 8. Características de la morfología de los segmentos modificados del abdomen de machos de las especies de *Neotyphloceras*. (A) *Neotyphloceras rosenbergi*. (B) *Neotyphloceras boliviensis*. (C) *Neotyphloceras pardinasi*. (D) *Neotyphloceras chilensis*. (E) *Neotyphloceras crackensis*, (F) *Neotyphloceras crassispina* ssp.

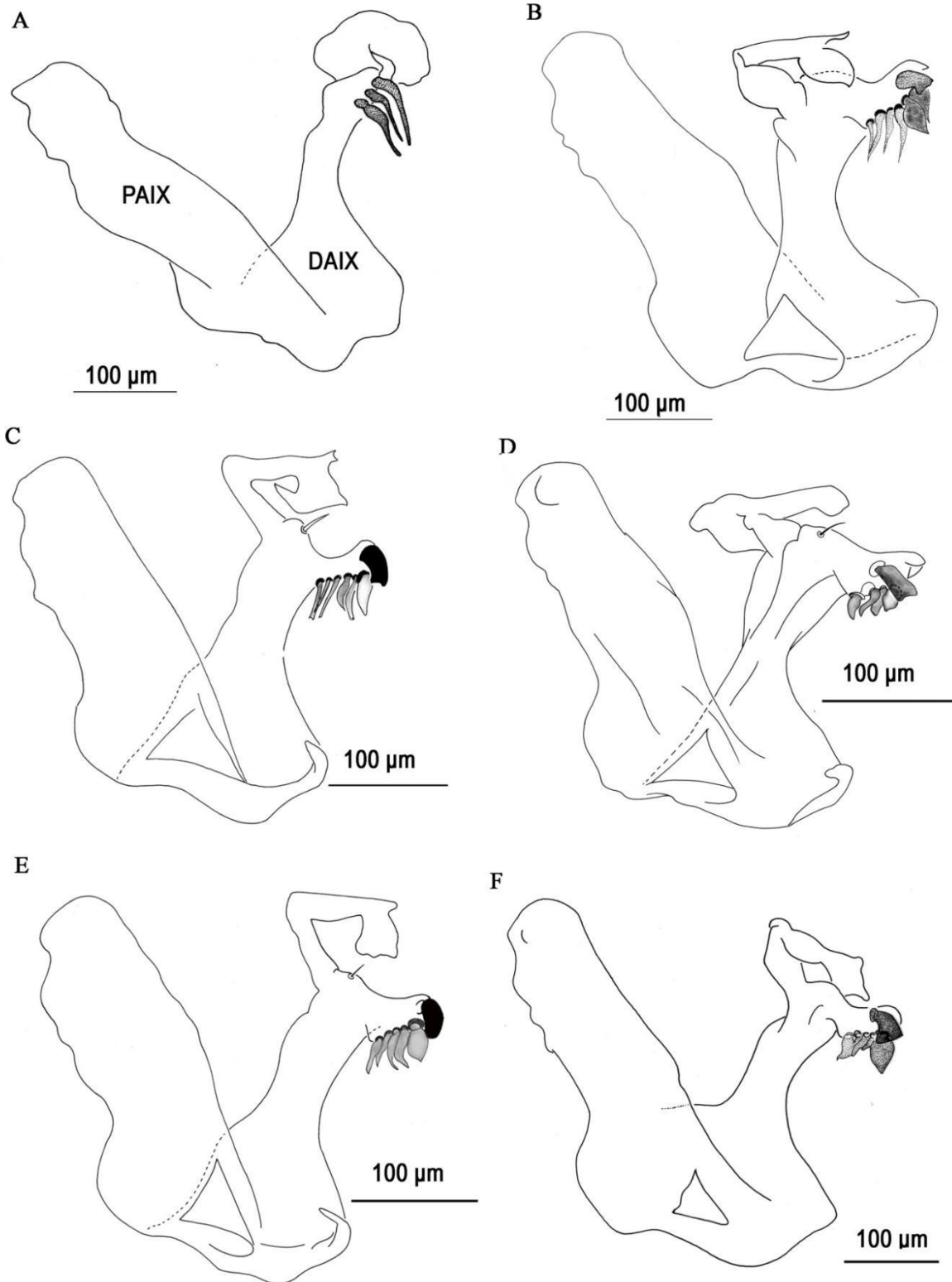


Figura 9. Características de la morfología y quetotaxia del Esternito IX de machos de las especies de *Neotyphloceras*. (A) *Neotyphloceras rosenbergi*. (B) *Neotyphloceras boliviensis*. (C) *Neotyphloceras pardinasi*. (D) *Neotyphloceras chilensis*. (E) *Neotyphloceras crackensis*. (F) *Neotyphloceras crassispina* ssp.

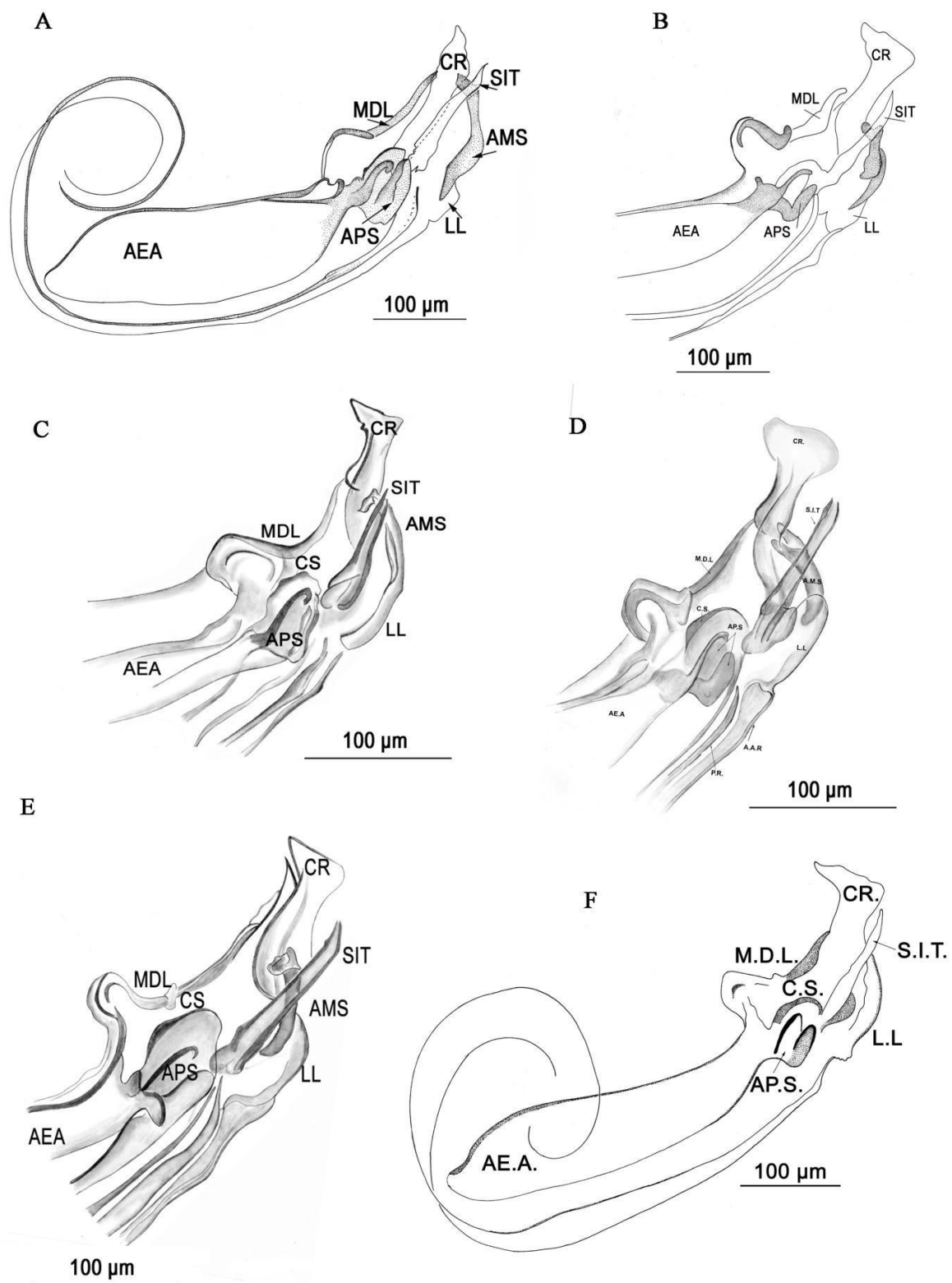


Figura 10. Características de la morfología del aedeagus de las especies de *Neotyphloceras*. (A) *Neotyphloceras rosenbergi*. (B) *Neotyphloceras boliviensis*. (C) *Neotyphloceras pardinassii*. (D) *Neotyphloceras chilensis*. (E) *Neotyphloceras crackensis*. (F) *Neotyphloceras crassispina* ssp.

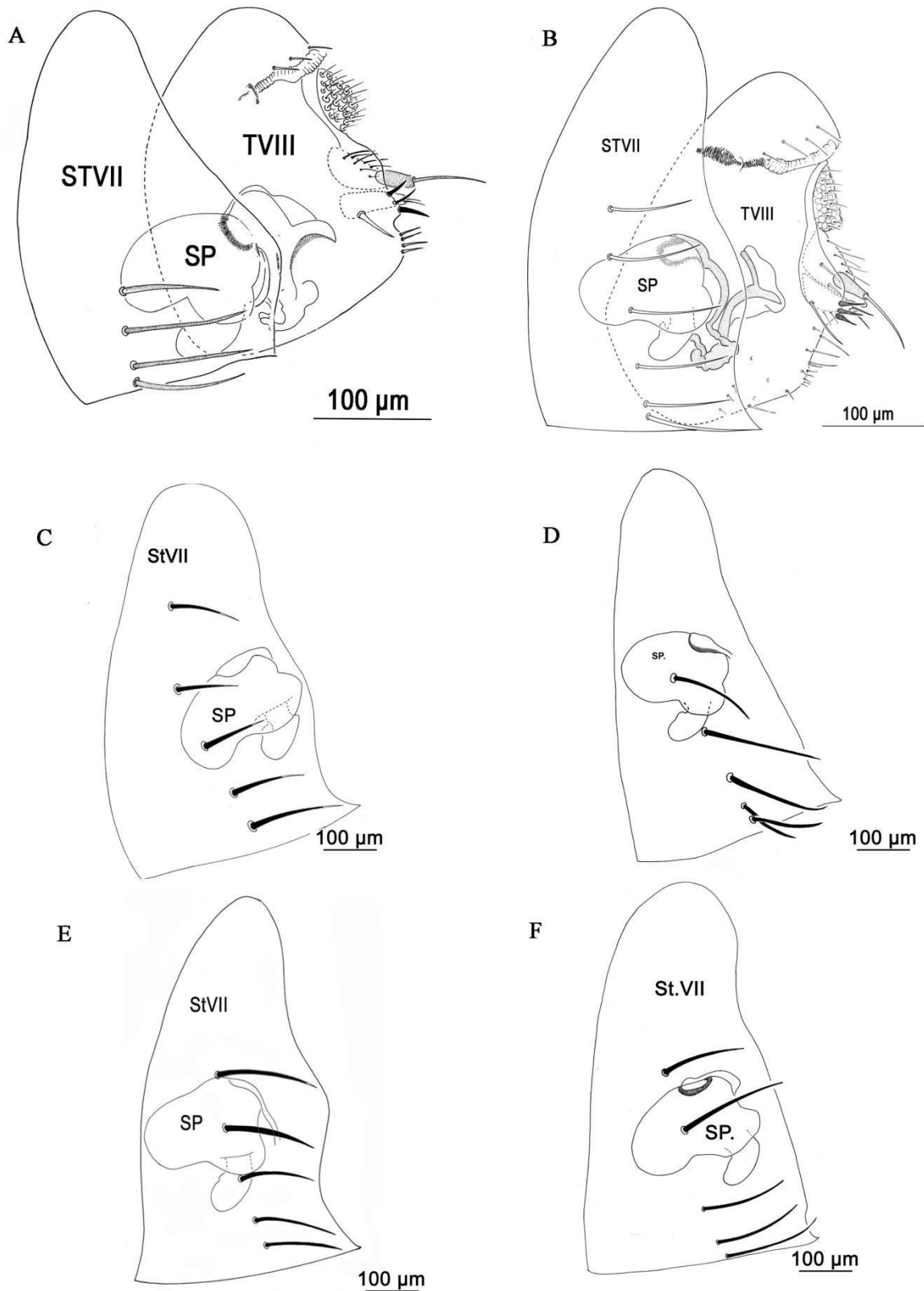


Figura 11. Características de la morfología y quetotaxia de los esternitos VII y VIII de las hembras de *Neotyphloceras*. (A) *Neotyphloceras rosenbergi*. (B) *Neotyphloceras boliviensis*. (C) *Neotyphloceras pardinasi*. (D) *Neotyphloceras chilensis*. (E) *Neotyphloceras crackensis*. (F) *Neotyphloceras crassispina* ssp.

5.2 EXTRACCIÓN DE ADN Y AMPLIFICACIÓN DEL MARCADOR COI

Del total de 58 ejemplares identificados a nivel genérico como *Neotyphloceras* spp., se analizaron molecularmente 45 muestras, colectadas en N= 32 roedores sigmodontinos de la Patagonia Argentina (Tabla 2).

Tabla 2. Colección de muestras de *Neotyphloceras* spp. en roedores sigmodontinos en la región patagónica argentina. ID interno molecular (Nº molecular), ID interno de campo (Nº campo), especies hospedadores, localidades de colecta y número de pulgas por hospedador.

Nº MOLECULAR	Nº CAMPO	HOSPEDADOR	LOCALIDAD	PROVINCIA	Nº DE MUESTRAS
JS1	DUS 521	<i>Eligmodontia typus</i>	Isla Escondida	Chubut	1
JS2	PPA 1082	<i>Eligmodontia typus</i>	Ea. La Madrugada, frente al faro de Mte. Loayza	Santa Cruz	2
JS3	PPA 942	<i>Abrothrix hirta</i>	Alm. Hotel Los Manantiales, Río Senger	Chubut	2
JS4	DUS 762	<i>Graomys griseoflavus</i>	Los Nogales	Chubut	1
JS5	DUS 653	<i>Eligmodontia typus</i>	Puerto Piojo	Chubut	2
JS6	DUS 529	<i>Graomys griseoflavus</i>	Isla Escondida	Chubut	1
JS7	MW 13	<i>Graomys griseoflavus</i>	Rio Negro	Rio Negro	1
JS8	DUS 490	<i>Graomys griseoflavus</i>	Bahía Cracker	Chubut	2
JS9	DUS 494	<i>Graomys griseoflavus</i>	Bahía Cracker	Chubut	3
JS10	PPA 183	<i>Phyllotis xanthopygus</i>	ANP Domuyo: Aguas Calientes	Neuquén	1
JS11	LTU 642	<i>Abrothrix olivacea</i>	Puerto Santa Cruz	Santa Cruz	1
JS12	LTU 660	<i>Abrothrix olivacea</i>	Puerto Santa Cruz	Santa Cruz	1
JS13	DUS 696	<i>Reithrodon auritus</i>	Pico Salamanca	Chubut	2
JS14	LTU 643	<i>Abrothrix olivacea</i>	Puerto Santa Cruz	Santa Cruz	1
JS15	DUS 705	<i>Reithrodon auritus</i>	Pico Salamanca	Chubut	1
JS16	MW 106	<i>Graomys griseoflavus</i>	Rio Negro	Rio Negro	1
JS17	DUS 548	<i>Akodon iniscatus</i>	Isla Escondida	Chubut	1

JS18	DUS 481	<i>Eligmodontia typus</i>	Bahía Cracker	Chubut	1
JS19	MW 99	<i>Graomys griseoflavus</i>	Rio Negro	Rio Negro	1
JS20	LTU 669	<i>Abrothrix olivacea</i>	Pali Aike	Santa Cruz	1
JS21	DUS 497	<i>Graomys griseoflavus</i>	Bajo de los huesos	Chubut	2
JS22	MW 112	<i>Graomys griseoflavus</i>	Rio Negro	Rio Negro	1
JS23	DUS 401	<i>Phyllotis xanthopygus</i>	Caolineria Dique Ameghino	Chubut	1
JS25	LTU 650	<i>Abrothrix olivacea</i>	Puerto Santa Cruz	Santa Cruz	1
JS26	LTU 509	<i>Abrothrix hirta</i>	Ea. El Maitén	Chubut	2
JS27	LTU 508	<i>Abrothrix hirta</i>	Ea. El Maitén	Chubut	1
JS28	DUS 563	<i>Akodon iniscatus</i>	Cabo Raso	Chubut	1
JS29	DUS 143	<i>Abrothrix hirta</i>	Ea. Leleque, cuadro La Potrada	Chubut	2
JS30	DUS 342	<i>Abrothrix olivacea</i>	Ea. La Madrugada	Chubut	1
JS31	DUS 487	<i>Graomys griseoflavus</i>	Bahía Cracker	Chubut	2
JS32	DUS 184	<i>Abrothrix olivacea</i>	Ea. El Maitén	Chubut	1
JS33	DUS 145	<i>Loxodontomys micropus</i>	Ea. Leleque, cuadro La Potrada	Chubut	3

El protocolo de extracción de ADN Chelex modificado fue eficiente en 17 muestras. En la Fig. 12, se puede ver la incisión en primer segmento abdominal en las muestras de *Neotyphloceras* realizada previamente a la extracción, donde se observa la morfología de la pulga intacta.

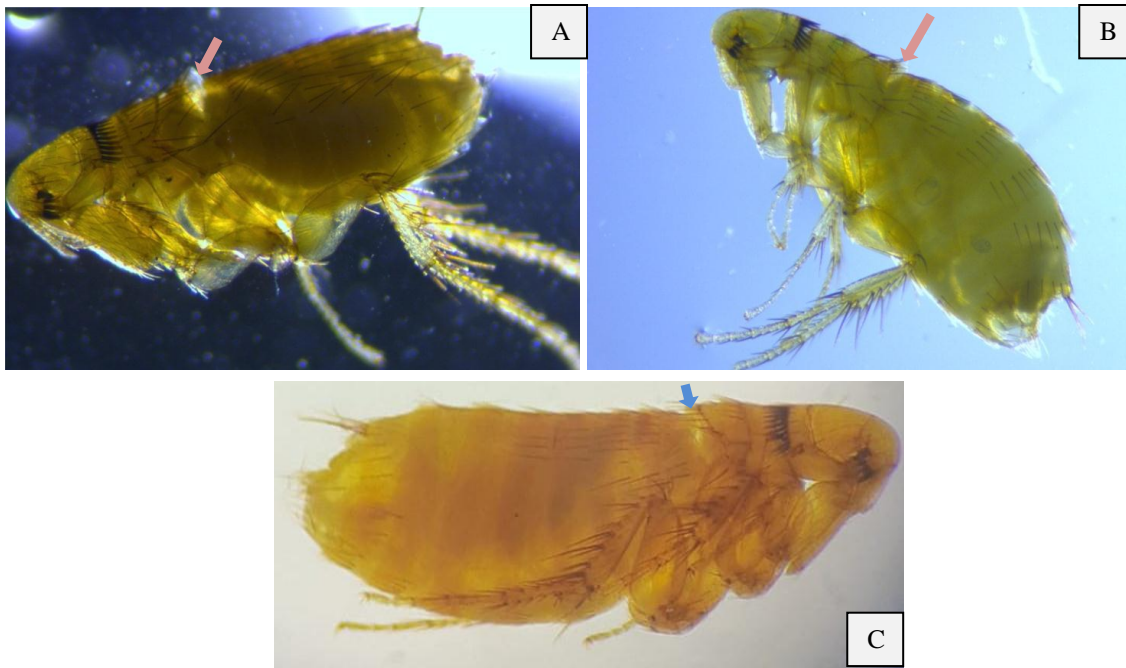


Figura 12. Incisión en el primer segmento abdominal en pulgas hembras *Neotyphloceras* spp, visualizado en la lupa estereoscópica. (A) Muestra JS1; (B) Muestra JS6; (C) Muestra JS14.

Posteriormente se realizó la extracción mediante el protocolo CTAB en N= 16 pulgas de *Neotyphloceras*, resultando en una eficiencia de extracción genómica en 32 muestras (Tabla 3).

Tabla 3. Protocolo de extracción en muestras de *Neotyphloceras* spp. en roedores sigmodontinos en la región patagónica argentina. En la misma se observa el ID interno molecular (Nº molecular), provincia, año de muestreo, protocolos de extracción utilizados (Chelex-100 y CTAB).

Nº MOLECULAR	PROVINCIA	AÑO DE MUESTREO	CHELEX-100	CTAB
JS1	Chubut	2009		X
JS2	Santa Cruz	2013	X	
JS3	Chubut	2013	X	
JS4	Chubut	2009	X	
JS5	Chubut	2009		X
JS6	Chubut	2009	X	
JS7	Rio Negro	2019	X	
JS8	Chubut	2009	X	
JS9	Chubut	2009	X	
JS10	Neuquén	2010	X	
JS11	Santa Cruz	2008	X	
JS12	Santa Cruz	2008		X
JS13	Chubut	2009		X

JS14	Santa Cruz	2008	X	
JS15	Chubut	2009		X
JS16	Rio Negro	2019	X	
JS17	Chubut	2009		X
JS18	Chubut	2009		X
JS19	Rio Negro	2019	X	
JS20	Santa Cruz	2008		X
JS21	Chubut	2009	X	
JS22	Rio Negro	2019	X	
JS23	Chubut	2006		X
JS25	Santa Cruz	2008	X	
JS26	Chubut	2007		X
JS27	Chubut	2007		X
JS28	Chubut	2009	X	
JS29	Chubut	2006		X
JS30	Chubut	2006		X
JS31	Chubut	2009		X
JS32	Chubut	2006		X
JS33	Chubut	2006		X

Se logró amplificar de manera correcta el fragmento de 453 pb del marcador mitocondrial COI en N=32 (Fig. 13).

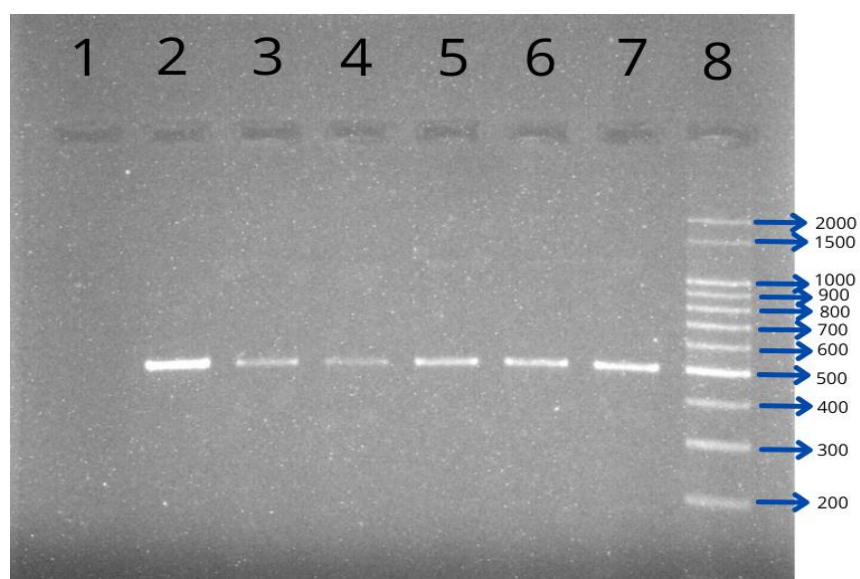


Figura 13. PCR para los 453 pb del marcador molecular COI en *Neotyphloceras* spp. La calle 1 corresponde al control negativo, las calles 2 al 7 a las muestras JS5, JS13, JS26, JS29 y JS31 y, por último, en la calle 8 se encuentra el marcador de peso molecular *qLadder 100 pb precision*.

5.3 ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA

La secuenciación directa fue exitosa en 12 de las 32 secuencias analizadas, correspondientes a las muestras JS2, JS3, JS4, JS6, JS7, JS8, JS9, JS11, JS16, JS19, JS21 y JS22. En el anexo 3 se pueden visualizar dos cromatogramas obtenidos a partir de la secuenciación estándar realizada por la empresa Macrogen (Corea).

El set total de secuencias N=12 se agrupó en 10 haplotipos (Tabla 4).

Tabla 4. Haplotipos obtenidos para el fragmento de 453 pb de COI analizado para 12 secuencias de pulgas del género *Neotlyphloceras* de la Patagonia Argentina.

Haplotipo	Frecuencia	Identificación de las secuencias
1	1	JS2
2	1	JS3
3	1	JS4
4	1	JS6
5	1	JS7
6	2	JS8 JS11
7	2	JS9 JS22
8	1	JS16
9	1	JS19
10	1	JS21

Al incorporar al análisis la única secuencia de *Neotlyphloceras* reportada hasta el momento, *Neotlyphloceras crassispina* ssp., las 13 secuencias fueron agrupadas en 11 haplotipos (Tabla 6).

Tabla 6. Haplotipos obtenidos para el fragmento de 453 pb de COI analizado para 12 secuencias de pulgas del género *Neotlyphloceras* de la Patagonia Argentina y la secuencia de *Neotlyphloceras crassispina* ssp. reportada.

Haplotipo	Frecuencia	Identificación de las secuencias
1	2	JS9 JS22
2	2	JS8 JS11
3	1	JS7
4	1	JS6
5	1	JS4
6	1	JS3

7	1	JS21
8	1	JS2
9	1	JS19
10	1	JS16
11	1	<i>Neotyphloceras crassispina</i> ssp.

Para N=12, se obtuvo un índice de diversidad nucleotídica por sitio (Pi) = 0,032 ± 0,008 e índice de diversidad haplotípica (Hd) = 0,970± 0,044. En los 10 haplotipos, se hallaron 35 sitios polimórficos (Tabla 5).

Tabla 5. Sitios polimórficos obtenidos a partir del fragmento de 453 pb del gen COI. En la misma se observa para cada haplotipo, la posición nucleotídica variable, donde el punto significa identidad y las letras la mutación propiamente dicha.

Haplotipo	Posición nucleotídica																																				
	3	10	22	24	29	37	54	63	72	106	108	118	132	147	159	161	162	165	209	231	240	246	255	270	279	282	309	310	312	313	348	354	360	366	369		
Haplotipo 1	T	T	C	C	G	G	G	A	C	G	T	C	A	T	C	T	T	G	G	T	T	T	T	G	A	T	G	C	T	C	T	A	A	C	A		
Haplotipo 2	A	G	.	.	
Haplotipo 3	C	C	T	A	.	.	A	.	T	A	C	T	T	A	T	.	A	A	.	C	C	A	.	A	T	C	A	T	A	T	C	T	T	T	T		
Haplotipo 4	A
Haplotipo 5	C	C	A	G	C	.	.	.	C	.	.	.	A	
Haplotipo 6	C	.	T	A	.	.	A	.	T	.	C	T	T	A	T	.	A	A	.	C	C	A	.	A	T	C	A	T	A	T	C	T	T	T	T		
Haplotipo 7	A	A
Haplotipo 8	A	G	A	
Haplotipo 9	A	G	C	.	.	A	
Haplotipo 10	A	G	.	.

El análisis de la diversidad genética de las secuencias de interés en comparación a la secuencia de *Neotyphloceras crassispina* ssp., brindó un valor de Pi = 0,11687 ± 0,06805 y de Hd = 0,974 ± 0,039.

El número de sitios polimórficos calculado para este set de datos fue de 231. La secuencia de *Neotyphloceras crassispina* ssp. presentó 217 sitios variables en comparación a las secuencias obtenidas en este estudio.

5.4 RELACIONES HAPLOTÍPICAS

La red haplotípica *Median Joining* (Fig. 14) identificó 2 grupos bien diferenciados, en donde uno de ellos agrupa a los haplotipos 1, 2, 4, 5, 7, 8, 9 y 10 y, por otro lado, a los haplotipos 3 y 6. Entre ambos grupos hay 25 mutaciones.

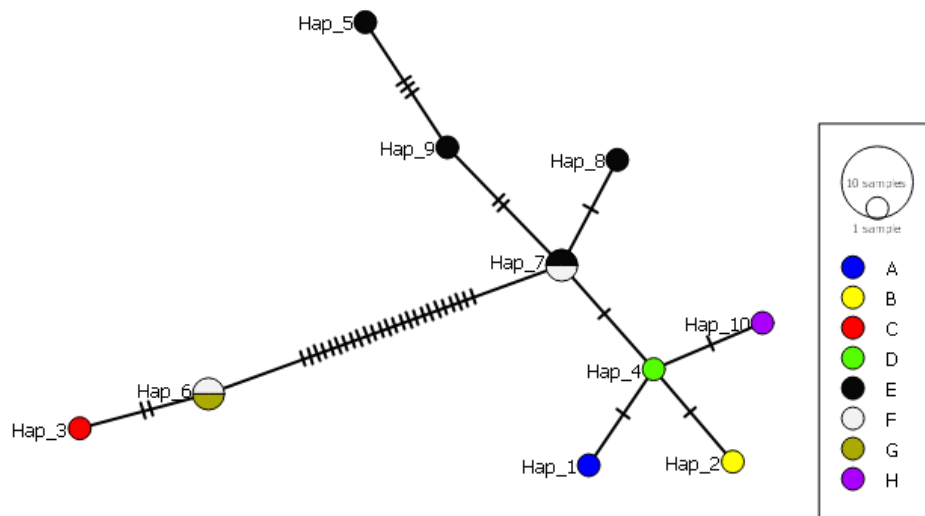


Figura 14. Red haplotípica obtenida mediante el análisis *Median Joining* a partir de un fragmento de 453 pb del gen COI analizado para las pulgas de la Patagonia Argentina. El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia de secuencias dentro de cada haplotipo y cada línea transversal entre ellos representa una mutación. Las letras corresponden a los sitios de muestreo: (A) Ea. La Madrugada, frente al faro de Mte. Loayza. (B) Alm. Hotel Los Manantiales, Río Senger. (C) Los Nogales. (D) Isla Escondida. (E) Río Negro. (F) Bahía Cracker. (G) Puerto Santa Cruz. (H) Bajo de los huesos.

En cuanto a los haplotipos por sitios de muestreo (Fig. 15) se observa que los haplotipos 5 ,7, 8 y 9 se encontraron en la provincia de Río Negro, los haplotipos 2, 3, 4, 6, 7 y 10 en la provincia de Chubut, mientras que los haplotipos 1 y 6 en la provincia de Santa Cruz.

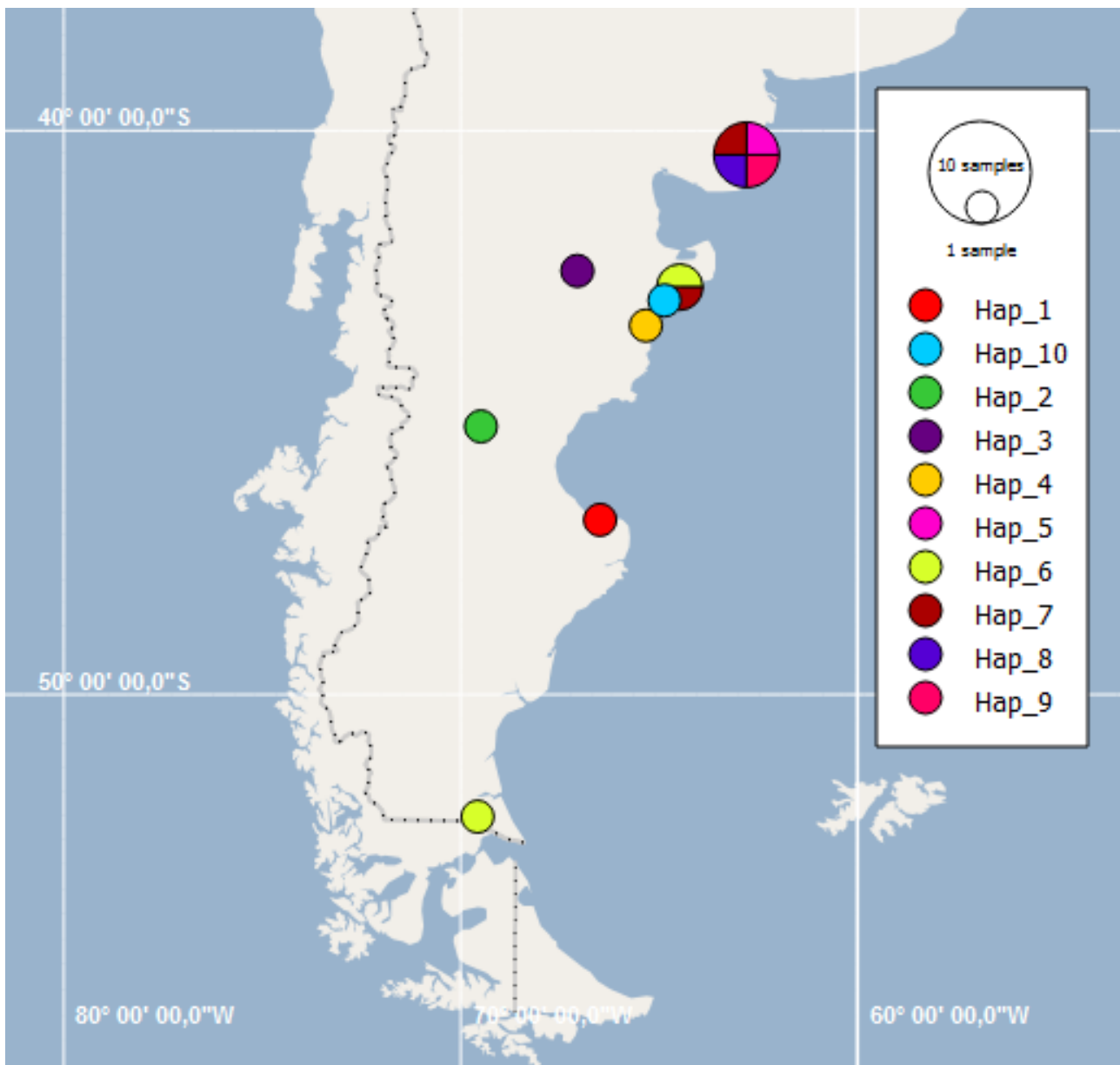


Figura 15. Haplotipos por sitios de muestreo mediante el análisis *Median Joining* a partir de un fragmento de 453 pb del gen COI analizado para las pulgas *Neotlyphloceras* spp. de la Patagonia Argentina. El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia de los haplotipos por sitio de muestreo.

Cuando se visualizaron las relaciones entre los 10 haplotipos en base a la distribución por ecorregiones (Fig. 16), se observó la formación de los mismos 2 grupos obtenidos en el análisis de los haplotipos por sitios de muestreo. En la ecorregión bosque se encontró solo un haplotipo (haplotipo 2). En la ecorregión monte se localizaron diez haplotipos (haplotipos 4,5,6,7,8,9,10) siendo el haplotipo 7 el más frecuente. Paralelamente, se halló un haplotipo compartido por la ecorregión estepa

(haplotipo 6). Por último, en la ecorregión estepa se hallaron tres haplotipos (haplotipos 3,6,1).

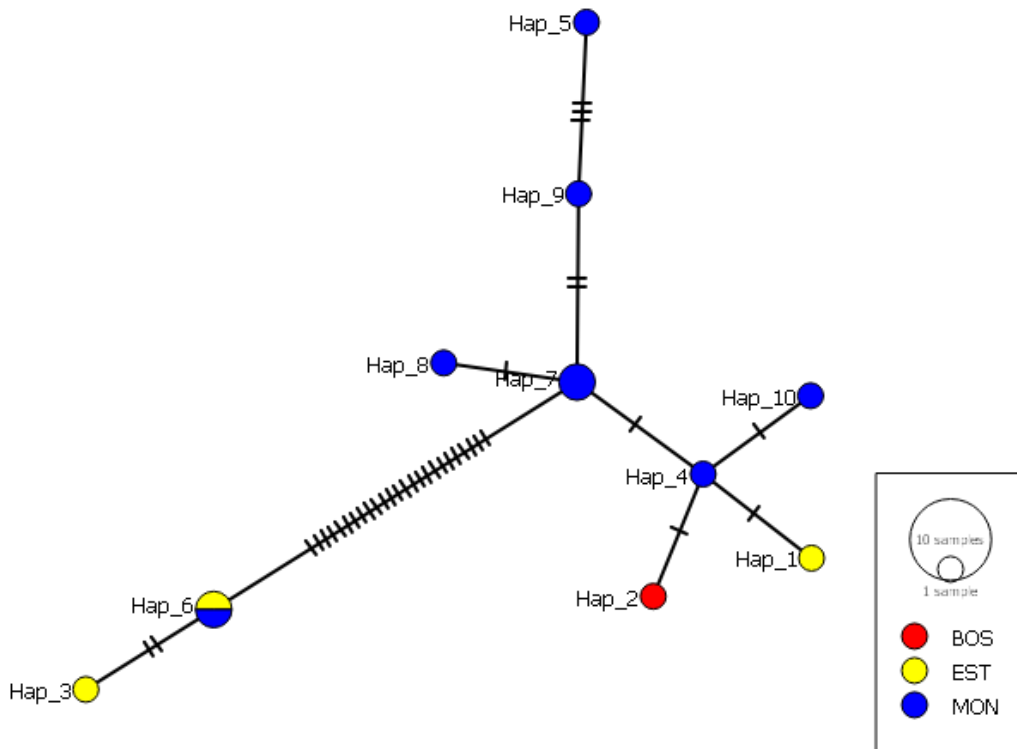


Figura 16. Relaciones haplotípicas mediante el algoritmo *Median Joining* entre los 10 haplotipos localizados en las ecorregiones Monte, Bosque y Estepa patagónica. El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia de haplotipos y cada línea entre los haplotipos representa una mutación. El color indica las ecorregiones.

5.5 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Se obtuvo la misma topología de árbol filogenético mediante las metodologías NJ y MV, por lo que se muestra el primero (Fig.17). El *outgroup* (*Rattus rattus*) funcionó correctamente ya que enraizó al árbol de manera correcta. Se visualiza la formación de 2 grandes grupos. En uno de ellos, están todas las secuencias de este estudio, junto a secuencias obtenidas de *GenBank* de *Ctenophtalmus nobilis*, *Ctenophtalmus obtusus* y *Ctenophtalmus uncinatus*, pertenecientes a un género reportado para la Argentina y se observa la formación de subclados con secuencias de *Vermipsylla Alakurt*, *Stephanocircus pectinipes*, *Ischnopsyllus octatenus*, *Myodopsylla trisellis*, *Orchopeas caedans*, *Amalareus peniciliger*, *Nearctopsylla genialis genialis*, *Parapsyllus humboldti*,

Pulex irritans, *Chaetopsylla trichosa*. En el otro grupo se observa la formación de subclados con secuencias para el fragmento de COI de *Agastopsylla boxi boxi*, *Ctenophthalmus* sp., *Plocopsylla wolffsohni*, pertenecientes a géneros reportados en Argentina. La única secuencia de *Neotyphloceras* se encuentra en este grupo. Cabe resaltar que la agrupación obtenida no fue la que se esperaba de acuerdo a la clasificación taxonómica.

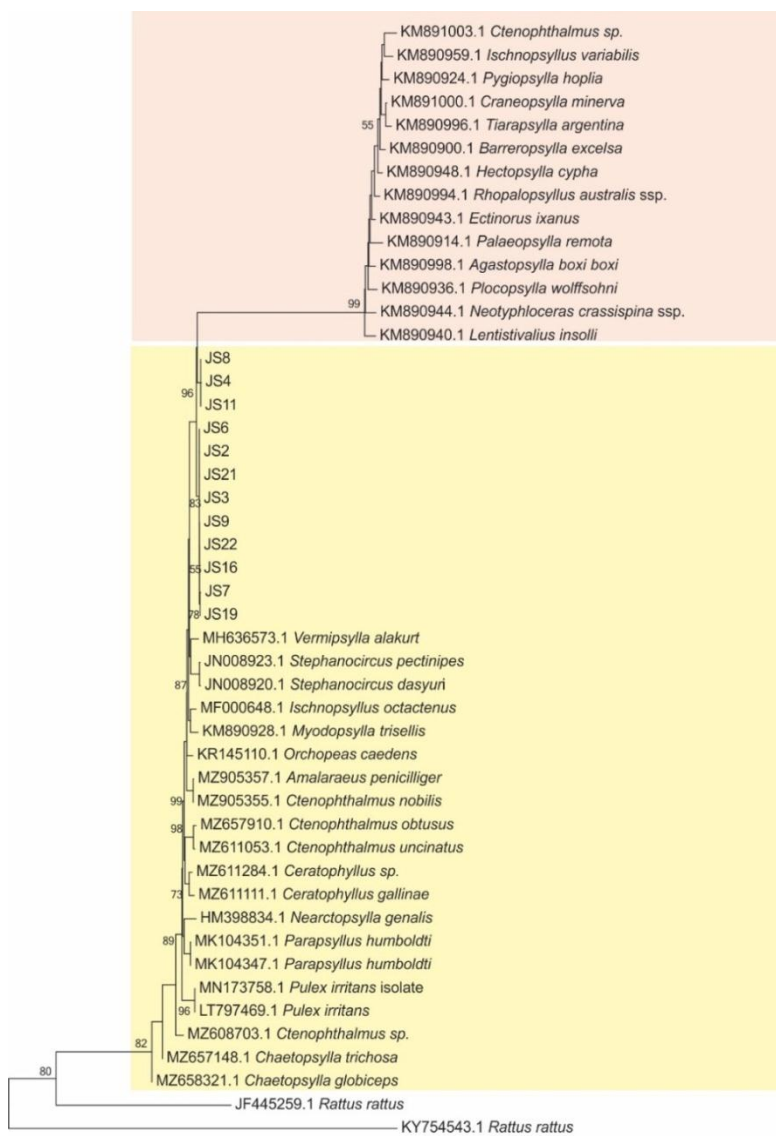


Figura 17. Árbol filogenético obtenido mediante la metodología de NJ a partir del fragmento de 453 pb del gen COI analizado para las 12 secuencias obtenidas de pulgas de *Neotyphloceras* de la Patagonia Argentina, 34 secuencias de Siphonaptera y 2 de Rodentia obtenidas de *GenBank*. En los nodos se observan los valores de *bootstrap* mayores o iguales a 50. En color se resaltan los dos grandes grupos obtenidos.

En dicho análisis filogenético, se observa que las secuencias obtenidas en este estudio se agruparon en 3 subgrupos. Por un lado, se encuentran las muestras JS8, JS4 y

JS11, por el otro, las muestras JS6, JS2, JS21 y JS3 y, por último, el otro subgrupo está formado por JS9, JS22, JS16, JS7 y JS19. Dicha asociación concuerda con lo visualizado en la red haplotípica (Fig. 16).

Por otro lado, se observa que los árboles filogenéticos realizados para los fragmentos de 415 y 635 pb para el gen COI (Anexos 4 y 5) no agrupan a las especies en base a su clasificación taxonómica, como tampoco el fragmento más grande nos da un mejor agrupamiento sistemático, sugiriendo que dicho marcador no es suficiente para la clasificación molecular de estos taxones.

6. DISCUSIÓN

El estudio de los parásitos asociados a mamíferos no sólo aporta información sobre los grupos parasitarios en sí, sino que a través de la relación parásito-mamífero hospedador, pueden generarse nuevos aportes a la Mastozoología y a otras disciplinas biológicas (Navone *et al.*, 2010). Con respecto a los parásitos del orden Siphonaptera, en Argentina las investigaciones comenzaron a partir de los años 60', con los trabajos de los entomólogos del Ponte, Capri y Mauri, cuyas contribuciones fueron principalmente el conocimiento sistemático de este grupo de ectoparásitos (Capri, 1960, 1978; del Ponte, 1963, 1967; Mauri y Capri, 1969; Mauri y Navone, 1988, 1993). Posteriormente, desde la década del 90', y continuando hasta la actualidad, las relaciones pulga-hospedador han sido estudiadas principalmente en la provincia de Buenos Aires y el norte argentino, así como también la morfología de las especies que son parásitas de micromamíferos, principalmente roedores (Lareschi, 1996 a; Lareschi y Iori, 1998; Lareschi y Linardi, 2005; Lareschi *et al.*, 2003a, b, c; 2004, 2007, 2010, 2011).

Para la Patagonia argentina, en la última década los principales estudios sobre pulgas se han enfocado principalmente en roedores sigmodontinos (Sánchez, 2013; Sánchez *et al.*, 2015). El exhaustivo análisis morfológico y sistemático de estos artrópodos permitió la descripción de nuevas especies para la ciencia (género *Neotyphloceras* Rothschild, 1914 y *Plocopsylla* Jordan 1931) y redescipción de otras, principalmente en base a la morfología del aedeagus (géneros *Agastopsylla* Jordan y Rothschild 1923, *Neotyphloceras*, *Plocopsylla* y *Tiarapsylla* Jordan, 1942) (Sánchez *et al.*, 2012; Sánchez y Lareschi, 2014; Sánchez *et al.*, 2015, 2018).

Uno de los géneros con mayores prevalencias y abundancias en roedores sigmodontinos de la Patagonia es *Neotyphloceras* (Sánchez y Lareschi, 2019). Este género fue descrito en 1914 por Rothschild distinguiendo dos especies: *Neotyphloceras rosenbergi* y *Neotyphloceras crassispina*, con tres subespecies (*N. crassispina crassispina*, *N. crassispina hemisus* y *N. crassispina chilensis*), identificadas a partir de ejemplares machos, por diferencias en la longitud y forma del proceso fijo del clasper, y la distancia de la seta más distal a su ápice (Rothschild, 1914; Jordan 1936; Hopkins y Rothschild 1966). Posteriormente, Smit (1968) propuso distinguir a las hembras de estas tres subespecies sobre la base del número y la ubicación de la seta lateral superior del

terguito VIII. Sin embargo, esta característica no fue considerada convencionalmente y durante varias décadas la identificación subespecífica de las hembras se basó en el acompañamiento de los machos (Hastriter 2001; Lareschi *et al.*, 2010). En la última década, especialistas argentinas han realizado varios aportes al conocimiento morfológico y taxonómico de este género: *N. crassispina chilensis* y *N. crassispina hemisus* fueron redesignadas, respectivamente por Sánchez *et al.* (2012) y López Berrizbeitia *et al.* (2015); cambiando el status taxonómico a especie en el caso de *N. chilensis*; las especies *N. crackensis* y *N. pardinasi* fueron descritas por Sánchez y Lareschi, (2014) a partir de ejemplares colectados en la Patagonia argentina y *N. boliviensis* fue descrita por Sánchez *et al.*, (2018) en base a material estudiado de Bolivia. De este modo, en la actualidad este género incluye 7 especies y subespecies, que han sido caracterizadas por la quetotaxia de la cabeza, tórax y patas, presencia de gruesas setas abdominales, denominadas spinelets y por diferencias morfológicas en las características de segmentos abdominales modificados y la genitalia en ambos sexos (Rothschild, 1904; Jordan, 1936; Sánchez *et al.*, 2012; Sánchez y Lareschi, 2014; López Berrizbeitia *et al.*, 2015).

La distribución geográfica del género *Neotyphloceras* abarca desde Venezuela hasta el sur de Chile y Argentina e incluye un extenso rango de hábitats que varían en diversidad (Fig. 18). En Argentina, las especies de este género se distribuyen en una gran variedad de ecorregiones, desde el Noroeste argentino hasta la Patagonia (Hopkins y Rothschild, 1966; Sánchez y Lareschi, 2014; López Berrizbeitia *et al.*, 2015). En este estudio, el análisis de la morfología de ejemplares del género *Neotyphloceras*, que fueron colectados de roedores en distintas ecorregiones de la Patagonia, concuerda con estudios previos. Se identificaron dos especies, *N. crackensis*, distribuida en ambientes áridos del monte y estepa y *N. pardinasi*, en localidades más occidentales, con mayor humedad (ver sección 5.1). Asimismo, estos resultados amplían la distribución geográfica conocida de *N. crackensis* hacia el norte, con el registro en Viedma (Río Negro) y se mencionan nuevos registros en Chubut (Dique Ameghino y Río Senger) y Santa Cruz (Ea. La Madrugada, Mte. Loayza y Puerto Santa Cruz) (ver sección 5.1).



Figura 18. Distribución geográfica del género *Neotyphloceras* Rothschild (X) *Neotyphloceras rosenbergi* (Rothschild), (●) *Neotyphloceras chilensis* Jordan nov. comb., (○) *Neotyphloceras crassispina crassispina* Rothschild, (Δ) *Neotyphloceras crassispina hemisus* Jordan, (∇) *Neotyphloceras crackensis* Sanchez y Lareschi, (∞) *Neotyphloceras pardinasi* Sanchez y Lareschi, (≈) *Neotyphloceras boliviensis* Sanchez et al., (▪).

En particular para el género *Neotyphloceras*, como se mencionó anteriormente, si bien existe un gran caudal de información taxonómica generada a partir del estudio morfológico de sus especies, no existen estudios genéticos.

Clásicamente, la taxonomía y la sistemática de ectoparásitos se han definido mediante estudios morfológicos; sin embargo, en las últimas décadas las herramientas moleculares han tenido un gran impacto en la sistemática de este importante grupo de artrópodos. Debido a las peculiaridades biológicas y ecológicas que presentan las

diferentes especies ectoparásitas, los estudios genéticos se han convertido en una herramienta importante para explorar las relaciones poblacionales, delimitar especies, hacer análisis filogenéticos e, incluso, identificar potenciales zonas de riesgo de transmisión de enfermedades (Paternina *et al.*, 2016).

La necesidad de estudiar comparativamente enfoques morfológicos y moleculares dentro del Orden Siphonaptera ha sido reportada por varios autores en los últimos años (Whiting *et al.*, 2008; Marrugal *et al.*, 2013; Lawrence *et al.*, 2014; Zurita *et al.*, 2018).

De acuerdo con Tautz *et al.* (2003) y DeSalle *et al.* (2005), la información genómica debe ser un componente activo de la taxonomía moderna, pero la secuenciación del ADN no debe ser la única fuente de información. En este contexto, la combinación de datos tanto moleculares como morfológicos se ha vuelto más frecuente en estudios taxonómicos de pulgas recientes. Sin embargo, hasta ahora y a nivel mundial, existe sólo una secuencia reportada del género *Neotyphloceras*.

Actualmente, una parte del gen COI es considerado el “código de barras de ADN” usado para identificar varias especies de artrópodos usando la secuencia de nucleótidos desde un fragmento homólogo de este gen (Xiao *et al.*, 2010). Este enfoque propuesto por Hebert y colaboradores (2003), es rápido y efectivo, y la información obtenida es fácilmente estandarizada y comparada entre taxones (Xiao *et al.*, 2010). Sin embargo, el uso exclusivo de COI muestra algunas limitaciones. Por ejemplo, se pueden encontrar problemas técnicos y analíticos con el marcador COI debido a la presencia de genes mitocondriales integrados en genomas nucleares (Bensasson *et al.*, 2001). Otra limitación es el hecho de que los patrones de diversidad y evolución de este gen pueden estar fuertemente influenciados por el endosimbionte *Wolbachia* (Dittmar y Whiting, 2003; Heukelbach *et al.*, 2004). Este endosimbionte ha sido bien amplificado en pulgas (Dittmar y Whiting, 2003; Heukelbach *et al.*, 2004), reportándose algunos casos de hibridación introgresiva como la descubierta por Zurita *et al.*, (2016) entre las pulgas *Ctenocephalides felis* y *Ctenocephalides canis*. Por esta razón, evidencia adicional, como el análisis de marcadores nucleares o de morfología, es necesaria (Thielsch *et al.*, 2017).

La caracterización genética en este estudio halló 10 haplotipos, con un índice de Hd de $0,970 \pm 0,044$ y un índice de Pi de $0,032 \pm 0,008$. El valor de Hd obtenido es superior al bajo valor ($0,42889$) hallado por Azrizal-Wahid *et al.* (2020) para el gen COI en una población de Malasia de *C. felis* y es similar a los elevados índices hallados por

Lawrence y colaboradores (2006) en una población de *C. felis* de Australia ($H_d = 0,851$) y por Zhang *et al.* (2022) ($H_d = 0,834$) en poblaciones de *C. felis* y *P. irritans* en China.

Matthee (2020) en su estudio sobre ectoparásitos, reportó que todas las especies generalistas, a excepción de la garrapata *A. hebraeum*, perteneciente al género *Amblyomma*, tuvieron una mayor diversidad genética ($H_d \geq 0,93$) que las especialistas ($H_d \leq 0,91$). Esta diferencia puede explicarse debido a que los tamaños poblacionales de los parásitos generalmente son menores a los de sus hospedadores (Huyse *et al.*, 2005; Harimalala *et al.*, 2017), por lo que la diversidad genética intraespecífica es reducida debido a fluctuaciones poblacionales. Por lo tanto, los parásitos que son específicos de hospedadores mostrarán la menor diversidad genética, ya que dependen de un tipo de huésped para sobrevivir, mientras que la diversidad genética de los parásitos generalistas será mayor debido a que sus números poblacionales son más estables a lo largo de los paisajes (Li *et al.*, 2014). El valor de diversidad genética ($H_d = 0,97$) obtenido en este estudio es congruente con lo reportado por Matthee (2020).

En lo que respecta al valor de P_i , el valor hallado en el presente estudio es mayor al encontrado por Azrizal-Wahid *et al.* (2020) ($P_i = 0,00166$) para una población de pulgas de distintas regiones de Malasia Peninsular, y similar al valor encontrado por Lawrence y colaboradores ($P_i = 0,038$) para una población de pulgas de Australia, ambos para el gen COI.

Azrizal-Wahid *et al.* (2020) encontraron una menor diversidad nucleotídica para COI en comparación con COII y estos resultados se contradicen con los obtenidos por Lawrence *et al.* (2014), quienes reportaron mayor diversidad nucleotídica para el gen COI en una población de pulgas de Australia. La baja diversidad genética encontrada para la secuencia de COI en *C. felis* puede ser el resultado de un flujo génico no restringido entre poblaciones. Además, la diversidad genética baja puede relacionarse a la gran abundancia de gatos en la Malasia peninsular que podría incrementar la transferencia genética entre poblaciones de pulgas. Sin embargo, la cantidad de haplotipos (10) obtenida, que coincide con la del presente estudio, fue mayor en comparación a otros estudios, en los que solo se detectaron, 2, 3 y 6 haplotipos para COI en poblaciones de *C. felis* de Australia, Hong Kong y Nueva Zelanda, respectivamente (Chandra *et al.*, 2017; Šlapeta *et al.*, 2018). En este sentido, siguiendo los valores obtenidos en las mencionadas investigaciones, los datos de la diversidad obtenidos en este trabajo son muy elevados.

La caracterización genética con la única secuencia de *Neotyphloceras crassispina* reportada dio la presencia de un haplotipo más (11 haplotipos totales), con valores de $Pi = 0,11687 \pm 0,06805$ y de $Hd = 0,974 \pm 0,039$. La diversidad nucleotídica fue mayor a la diversidad obtenida para las 10 muestras en estudio y el valor de la diversidad haplotípica fue similar al obtenido en estas muestras. Estos valores superiores de diversidad fueron esperables debido a la gran cantidad de mutaciones que hay entre la secuencia tomada de *GenBank* y los datos generados en este estudio (ver apartado 5.4).

Zurita y Cutillas (2021) reivindicaron estudios moleculares y filogenéticos adicionales para el género *Ctenophthalmus* (Ctenophthalmidae), especialmente dirigido a discriminar entre ejemplares hembras que no podían ser identificados morfológicamente a nivel de especie y subespecies. Además, las claves morfológicas disponibles hasta ahora para la identificación de machos de *Ctenophthalmus* son difíciles de usar, siendo problemáticas o imposibles para los no especialistas (Beaucournu y Launay, 1990). Evidenciaron que la combinación del marcador nuclear EF1- α con los marcadores de ADN cytb y COI es una herramienta filogenética útil para discriminar entre taxones hembra del género *Ctenophthalmus*. En concordancia con autores previos (Hopkins y Rothschild 1966; Beaucournu y Launay 1990), Zurita y Cutillas (2021) concluyeron que solo el estudio de rasgos morfológicos en el género *Ctenophthalmus* no es capaz de discriminar a nivel de especie y subespecie en hembras y que, por lo tanto, se necesitan datos moleculares y filogenéticos para resolver este problema taxonómico. Los resultados del presente estudio concuerdan con lo dicho por Zurita y Cutillas (2021) debido a que el árbol filogenético para el fragmento de 453 pb del gen COI (Fig.18) agrupó no solo a los ejemplares de este estudio en un clado distinto al de la única secuencia de *Neotyphloceras* reportada hasta el momento, sino también que a los ejemplares que comparten una determinada familia, género o especie los agrupó en clados distintos.

Adicionalmente, los árboles filogenéticos (Anexos 4 y 5) para un fragmento de 415 y 636 pb del gen COI realizado a partir de secuencias tomadas de *GenBank*, agruparon también de manera errónea las secuencias de un mismo género y/o familia, por lo que se puede confirmar la baja resolución de este gen para este grupo de taxones.

La cantidad de mutaciones encontradas en este trabajo entre los 2 grandes grupos formados por las secuencias en estudio y las extraídas de *GenBank* para el gen COI es de 196 y resulta llamativa (Fig.17). Adicionalmente, secuencias de un mismo género se agruparon en distintos clados. En contraste, en el trabajo de Zurita y Cutillas (2021), todas las especies del subgénero *Ctenophthalmus* aparecen relacionadas unas con otras, formando un clado monofilético separado del resto de las especies congéneras. Adicionalmente, Hornok *et al.* (2018) reportaron entre 1 y 2 mutaciones para secuencias del gen COI en poblaciones de *C. canis* de la cuenca del Mediterráneo y Hungría, en comparación a las secuencias de referencia, encontrando una similitud de secuencias de entre el 99,6% y 100%. Filogenéticamente, todas las secuencias de *C. canis* se agruparon juntas. Estos investigadores reportaron que las secuencias de *P. irritans* para el gen COI colectadas de humanos solo presentaron 2 mutaciones, respecto a las secuencias de referencia, reportando una similitud del 99,6%. Pero para las *P. irritans* aisladas de 3 especies de carnívoros reportaron 19 nucleótidos distintos, en comparación a las secuencias de referencia, con una similitud del 96,1%. Por lo tanto, la cantidad de mutaciones calculadas en este estudio (196) es elevada, considerando que el marcador usado fue COI y que estamos considerando a una misma especie.

Con respecto a la localización de los haplotipos estudiados, no se encontró un patrón de distribución determinado. Estos resultados sugieren que puede no haber una relación simple entre la similitud genética (haplotipos) y las regiones geográficas para las pulgas del género *Neotyphloceras*, conforme a los resultados obtenidos por de la Cruz y Whiting (2003), en su estudio sobre *Pulex simulans* en Perú.

Como se mencionó el género *Neotyphloceras* en particular, no existen investigaciones moleculares previas, siendo este trabajo el primero en realizar la caracterización tanto morfológica como molecular de las pulgas del género en cuestión. Sin embargo, la primera caracterización realizada por Zhu *et al.* (2015) no es concordante con los resultados del presente estudio, ya que la secuencia de un fragmento del gen COI para el ejemplar reportado como *N. crassispina* ssp. (N° acceso a *GenBank*: KM890944) presentó 217 mutaciones, lo cual no era esperable debido a la cercanía evolutiva con nuestras secuencias.

Lawrence *et al.* (2014) utilizaron los marcadores de ADN mitocondrial COI y COII para identificar especies del género *Ctenocephalides* y mostraron que ambos

marcadores resolvieron una filogenia idéntica. Si bien el marcador COI proporcionó un mayor nivel de diversidad de nucleótidos, COII superó a COI en diversidad de aminoácidos. La secuencia de aminoácidos de COII resolvió los cinco clados y proporciona una señal filogenética adicional. En el presente trabajo solo se utilizó el marcador COI y la información obtenida no fue suficiente para identificar especies del género *Neotyphloceras*. A pesar de eso, sirvió como un primer análisis exploratorio sobre la caracterización molecular del género a nivel mundial.

Si bien la extracción de ADN utilizando la resina Chelex es un método fácil, corto, requiere de pocos reactivos adicionales y es menos riesgoso para la salud del investigador, su eficiencia en este trabajo no fue óptima. La resina Chelex-100 actúa como una resina quelante de iones metálicos polivalentes, iones que actúan como catalizadores en la ruptura de ADN a altas temperaturas las cuales pueden inhibir la PCR (González *et al.*, 2004). Estudios previos muestran que el uso de la resina Chelex sin proteinasa K proporciona una adecuada cantidad de ADN para amplificar (Sepp, 1994), aunque también indican algunos límites considerando el tamaño de los productos que pueden ser amplificados. Se podrían amplificar fragmentos de hasta 650 pb en muestras tratadas sólo con la resina Chelex-100, y fragmentos de hasta 1000 pb en las que se ha utilizado la resina y digestión con proteinasa K. El fragmento de interés de este trabajo fue de 453 pb, por lo que no se esperaba encontrar mayores dificultades en su amplificación. Para aquellas muestras en las que el protocolo de resina, aún modificado, no funcionó, se realizó la extracción de ADN con el protocolo de CTAB (Tabla 3). En nuestro trabajo encontramos una asociación negativa en el tiempo de colecta del ectoparásito y el éxito en la eficiencia de extracción de ADN, donde en las muestras tomadas hace más de 10 años, no se pudo extraer ADN efectivamente mediante esta metodología (Tabla 3).

Es importante mencionar algunas recomendaciones para el correcto manejo de Chelex: preparar la solución de Chelex en el momento de la extracción y resuspenderla al momento de su uso y, al tomar el sobrenadante, tener mucho cuidado para no tomar partículas de Chelex que son inhibitoras de la *Taq* polimerasa durante la amplificación.

Los resultados obtenidos a partir del desarrollo de la presente tesis permiten formular 2 preguntas con sus respectivas respuestas potenciales:

¿Se correlacionan los resultados obtenidos a partir de estudios morfológicos y moleculares? No, mientras que el análisis molecular clasificó a las muestras en 3 subgrupos, el análisis morfológico las agrupó dentro de 2 especies.

¿El uso del gen COI es informativo para este género? Podríamos decir que no, debido a que en los árboles filogenéticos obtenidos en este trabajo se observa que la única secuencia de *Neotyphloceras* reportada hasta el momento, identificada como *N. crassispina* ssp, se agrupó en un subgrupo diferente al de los ejemplares estudiados. Lo mismo sucedió con ejemplares del género *Ctenophtalmus*. Si bien se esperaba que ejemplares de un mismo género se agrupen entre sí por estar más relacionados evolutivamente, esto no sucedió. Por este motivo, para poder realizar un análisis más exhaustivo, se sugiere la necesidad de incorporar otros genes como por ejemplo Factor de elongación 1 alfa (EF-1 alpha), Citocromo b (Cytb), Espaciador Transcrito Interno 1 (ITS1) y Espaciador Transcrito Interno 2 (ITS2) (Zurita y Cutillas, 2021).

Este estudio sienta las bases para futuras investigaciones sobre Siphonaptera, y pone en relevancia la utilización complementaria de estudios morfológicos y moleculares, utilizando marcadores mitocondriales y/o nucleares, más informativos, que permitan discriminar de manera eficiente las especies de pulgas. Con respecto al género *Neotyphloceras* en particular, este trabajo aporta a su conocimiento genético debido a que existe una única secuencia reportada para el género disponible en *Genbank*.

7. CONCLUSIONES

Es el primer trabajo en Argentina que involucra tanto aspectos moleculares como morfológicos de los sifonápteros y junto al trabajo de Zurita y Cutillas (2021) es una investigación pionera en el estudio sistemático de especies de la familia Ctenophthalmidae.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demostraron diferencias morfológicas y moleculares para los ejemplares de *Neotyphloceras*, a partir del fragmento del marcador mitocondrial citocromo oxidasa I. La diversidad genética calculada en las secuencias fue elevada.

El análisis molecular clasificó a las 12 secuencias obtenidas en 2 subgrupos, mientras que el análisis morfológico las agrupó dentro de las especies *N. crackensis* y *N. pardinasi*, no encontrándose una asociación entre dichos grupos. Por tal motivo, el marcador COI por sí solo no sería suficiente para la clasificación sistemática del género.

Este estudio preliminar sienta las bases para futuras investigaciones que complementen estudios morfológicos y moleculares en pulgas distribuidas en Argentina, cuyos resultados permitirán realizar un gran aporte al conocimiento sistemático de dichos ectoparásitos.

8. BIBLIOGRAFÍA

Abràmoff, M. D., Magalhaes, P. J., y Ram, S. J. (2004). Image Processing with Image J. *Biophotonics International*, 11(7), 36-42.

Autino, A. G., y Lareschi, M. (1998). Siphonaptera. *Biodiversidad de Artrópodos Argentinos. Una Perspectiva Biotaxonómica, Sur, La Plata*, 279-290.

Azrizal-Wahid, N., Sofian-Azirun, M., y Low, V. L. (2020). New insights into the haplotype diversity of the cosmopolitan cat flea *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *Veterinary parasitology*, 281, 109102.

Bandelt, H. J., Forster, P., y Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16 (1), 37–48.

Beaucournu, J. C., y Launay, H. (1990). The fleas (Siphonaptera) of France and the western Mediterranean Basin. *The fleas (Siphonaptera) of France and the western Mediterranean Basin.*, (76).

Beaucournu, J. C., y del Carmen Castro, D. (2003). Deux nouveaux *Tiamastus* Jordan, 1939, d'Argentine (Siphonaptera, Rhopalopsyllidae). *Bulletin de la Société entomologique de France*, 108(1), 49-53.

Bensasson, D., Zhang, D. X., Hartl, D. L., y Hewitt, G. M. (2001). Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. *Trends in ecology & evolution*, 16(6), 314-321.

Bitam, I., Dittmar, K., Parola, P., Whiting, M. F., y Raoult D. (2010). Fleas and flea-borne diseases. *International Journal of Infectious Diseases*, 14(8), e667–e676.

Brinkerhoff, R. J., Martin, A. P., Jones, R. T. y Collinge, S. K. (2011) Population genetic structure of the prairie dog flea and plague vector, *Oropsylla hirsuta*. *Parasitology*, 138, 71–79.

Burkart, R., Bárbaro, N. O., Sánchez, R. O., y Gómez, D. A. (1999). Eco-regiones de la Argentina.

Capri, J. J., y Capri, N. D. (1960). Notas sobre Suctoria Argentinos. IV. *Dasypsyllus monicae*, 373-376.

Capri, J. J. (1978). Pulgas coleccionadas sobre roedores capturados en Sierra de Ventana, una zona sur de la provincia de Buenos Aires. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 37(1-4).

Chandra, S., Forsyth, M., Lawrence, A. L., Emery, D., y Šlapeta, J. (2017). Cat fleas (*Ctenocephalides felis*) from cats and dogs in New Zealand: molecular characterisation, presence of *Rickettsia felis* and *Bartonella clarridgeiae* and comparison with Australia. *Veterinary Parasitology*, 234, 25-30.

Dantas-Torres, F., Latrofa, M. S., Annoscia, G., Giannelli, A., Parisi, A., y Otranto, D. (2013). Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* from the New and Old Worlds. *Parasites & vectors*, 6(1), 1-17.

de la Cruz, K. D., y Whiting, M. F. (2003). Genetic and phylogeographic structure of populations of *Pulex simulans* (Siphonaptera) in Peru inferred from two genes (CytB and Coll). *Parasitology Research*, 91(1), 55-59.

D'elía, G., González, E. M., y Pardiñas, U. F. J. (2003). Phylogenetic analysis of sigmodontine rodents (Muroidea), with special reference to the akodont genus *Deltamys*. *Mammalian Biology*, 68(6), 351-364.

D'Elía, G., Pardiñas, U. F., Teta, P., y Patton, J. L. (2007). Definition and diagnosis of a new tribe of sigmodontine rodents (Cricetidae: Sigmodontinae), and a revised classification of the subfamily. *Gayana*, 71(2), 187-194.

del Ponte, E. (1963). Notes on Argentine Suctoria. V. New data on *Rhopalopsyllidae*, *Rhopalopsyllinae*. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 26(1-4).

del Ponte, E. (1967). Notas sobre Suctoria argentinas. VII. *Plocopsylla traubi* sp. nov. (Stephanocircidae, Craneopsyllinae) del delta del Paraná (Buenos Aires). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 30(1-4).

DeSalle, R., Egan, M. G., y Siddall, M. (2005). The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical transactions of the royal society B: Biological sciences*, 360(1462), 1905-1916.

Dittmar, K., y Whiting, M. F. (2003). Genetic and phylogeographic structure of populations of *Pulex simulans* (Siphonaptera) in Peru inferred from two genes (CytB and Coll). *Parasitology Research*, 91, 55–59.

Durden, L. A., y Hinkle, N. C. (2019). Fleas (Siphonaptera). *Medical and veterinary entomology* (pp. 145-169). Academic press.

Doyle, J. J., y Doyle J. L. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 19 (1), 11-15.

Drummond, A. J., Suchard M. A., Xie D., y Rambaut A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29 (8), 1969–1973.

Eisen, R. J., y Gage, K .L. (2012). Transmission of flea-borne zoonotic agents. *Annual review of entomology*, 57, 61-82.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791.

Fontdevila, A., y Moya, A. (2007). *Introducción a la Genética de Poblaciones*. Editorial Síntesis.

Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz R., y Vrijenhoek R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3, 294 –299.

García García R., Onofri Yunez O., Lagares Guzmán A., Varela Prieto L. y Manjarrez N. (2022). Utilización de resina Chelex en la extracción de ADN de varios tipos de tejidos de la tortuga marina *Caretta caretta*, para la amplificación de marcadores moleculares. *El Caribe las ciencias básicas e ingeniería*, 343-354.

González, L. G., Tapia, J. R., Lazo, P. S., Ramos, S., y Nieto, C. S. (2004). Extracción de ADN con resina chelex en el análisis de la amplificación oncogénica en carcinomas de cabeza y cuello. *Acta Otorrinolaringológica Española*, 55(3), 139-144.

Hall, T. (2004). BioEdit version 7.0. 0. *Distributed by the author, website: www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html*.

Harimalala M., Telfer S., Delatte H., Watts P.C., Miarinjara A., Ramihangihajason T. R., Rahelinirina S., Rajerison M., y Boyer S. (2017). Genetic structure and gene flow of the flea *Xenopsylla cheopis* in Madagascar and Mayotte. *Parasites & vectors*, 10(1), 1-13.

Hastriter, M. W., y Sage, R. D. (2009). A description of two new species of *Ectinorus* (Siphonaptera: Rhopalopsyllidae) from laguna blanca National Park, Neuquén province, Argentina. *Proceedings of the entomological society of Washington*, 111(3), 581-597.

Hastriter, M. W. (2001). Fleas (Siphonaptera: Ctenophthalmidae and Rhopalopsyllidae) from Argentina and Chile with two new species from the rock rat *Aconaemys fuscus* in Chile. *Annals of Carnegie Museum*, 70, 169–178.

Hastriter, M. W., y Sage, R. D. (2011). Description of a new species of *Ectinorus* (*E. spiculatus*) (Siphonaptera, Rhopalopsyllidae) from Argentina and a review of the subgenus *Ichyonus* Smit, 1987. *ZooKeys*, (124), 1-18.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. y deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society*, 270, 313–322.

Hennig, W. (1966). *Phylogenetic systematics*. University of Illinois.

Hershey, A. D., y Chase, M. (1952). Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *Journal of general physiology*, 36(1), 39-56.

Heukelbach, J., Bonow, I., Witt, L., Feldmeier, H., y Fischer, P. (2004). High infection rate of *Wolbachia* endobacteria in the sand flea *Tunga penetrans* from Brazil. *Acta Tropica*, 92, 225–230.

Hopkins, G. H., y Rothschild, M. (1966). An Illustrated Catalogue of the Rothschild Collection of Fleas (*Siphonaptera*) in the British Museum (Natural History). *Vol. IV: Ctenophthalminae, Dinopsyllinae; Doratopsyllinae and Listropsyllinae*. British Museum (NaturalHistory), Londres.

Hornok, S., Beck, R., Farkas, R., Grima, A., Otranto, D., Kontschán, J., Takács, N., Horváth, G., Szőke, K., Szekeres, S., Majoros, G., Juhász, A., Salant, H., Hofmann-Lehmann, R., Stanko, M., y Baneth, G. (2018). High mitochondrial sequence divergence in synanthropic flea species (Insecta: Siphonaptera) from Europe and the Mediterranean. *Parasites y Vectors*, 11, 221.

Huysse T., Poulin R., y Théron A. (2005). Speciation in parasites: a population genetics approach. *Trends in Parasitology* 21: 469–475.

Igea de Castro, J. (2013). Desarrollo de nuevos marcadores genómicos y su aplicación a la filogenia y variabilidad genética de mamíferos. [Tesis doctoral, Universidad de Barcelona]. Repositorio institucional de la Universidad de Barcelona.

Jordan, K. (1936). Some Siphonaptera from South America. *Novitates Zoologicae*, 39, 305–310.

Krasnov, B. R., Mouillot, D., Shenbrot, G. I., Khokhlova, I. S., y Poulin, R. (2004). Geographical variation in host specificity of fleas (Siphonaptera) parasitic on small mammals: the influence of phylogeny and local environmental conditions. *Ecography*, 27(6), 787-797.

Krasnov, B. R. (2008). Functional and Evolutionary Ecology of Fleas: A Model for Ecological Parasitology. *Cambridge University Press*.

Marrugal, A., Callejón, R., De Rojas, M., Halajian, A., y Cutillas, C. (2013). Morphological, biometrical, and molecular characterization of *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* isolated from dogs from different geographical regions. *Parasitology Research*, 112(6), 2289-2298.

Matthee C. A (2020). The influence of host dispersal on the gene flow and genetic diversity of generalist and specialist ectoparasites, *African Zoology*, 55:2, 119-126.

Mauri, R., y Capri, J. J. (1969). Ectoparásitos (Acarina y Suctoria) de roedores del género *Akodon* (Cricetidae) en Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 32(1-4).

Mauri, R., y Navone, G. T. (1993). Common ectoparasites (Siphonaptera and Acari) of *Dasypodidae* (Mammalia: Xenarthra) in Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 52(1-4), 121-122.

Mauri, R., y Navone, G. (1988). Algunos ectoparásitos (Acarina-Suctoria) de marsupiales argentinos. *Neotropica*, 36(92), 125-131.

Musser, G. G, y Carleton, M. D (2005). Superfamily Muroidea. In: *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. *Johns Hopkins University Press*, (1), 894-1531.

Lareschi, M. (1996). Estudio preliminar de la comunidad de roedores (Rodentia: Muridae) y sus ectoparásitos (Acari, Phthiraptera y Siphonaptera) en Punta Lara (Buenos Aires). *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 55(1-4).

Lareschi, M. (1996). Nuevas citas de ácaros parásitos de roedores para la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 55(1-4).

Lareschi, M., y Iori, A. (1998). Nuevas citas de Siphonaptera (Rhopalopsyllidae e Hystrichopsyllidae) parásitos de roedores (Rodentia, Muridae) de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Revista Brasileira de Entomologia*, 41(2-4).

Lareschi, M., y Linardi, P. M. (2005). New data on the morphology of *Polygenis* (*Polygenis*) *rimatus* (Jordan) (Siphonaptera: Rhopalopsyllidae). *Neotropical Entomology*, 34, 121-125.

Lareschi, M., Autino, A., Díaz, M. M., y Barquez, R. M. (2003). New host and locality records for mites and fleas associated with wild rodents from northwestern Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 62(3-4), 60-64.

Lareschi, M., Linardi, P. M., Autino, A. G., Barquez, R. M., y Díaz, M. M. (2003). First report of *Polygenis* (*Polygenis*) *roberti* *beebei* (Fox, 1947) (Siphonaptera:

Rhopalopsyllidae) in Argentina, with a new host record and morphological data. *Systematic Parasitology*, 56(3), 183-187.

Lareschi, M., Notarnicola, J., Navone, G., y Linardi, P. M. (2003). Arthropod and filarioid parasites associated with wild rodents in the northeast marshes of Buenos Aires, Argentina. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 673-677.

Lareschi, M. (2004). Ectoparásitos asociados a machos y hembras de *Oxymycterus rufus* (Rodentia: Muridae): estudio comparativo en la Selva Marginal del río de La Plata, Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 63(3-4), 39-44.

Lareschi, M., Notarnicola, J., Nava, S., y Navone, G. (2007). Parasite community (arthropods and filarioids) associated with wild rodents from the marshes of La Plata River, Argentina. *Comparative Parasitology*, 74(1), 141-147.

Lareschi, M., Sánchez, J. P., Ezquiaga, M. C., Autino, A., Díaz, M. M., y Barquez, R.M. (2010). Fleas associated with mammals from Northwestern Argentina, with new distributional reports. *Comparative Parasitology*, 77, 215–221.

Lareschi, M., y Krasnov, B. R. (2010). Determinants of ectoparasite assemblage structure on rodent hosts from South American marshlands: the effect of host species, locality and season. *Medical and veterinary entomology*, 24(3), 284-292.

Lareschi, M., Autino, A. G., Díaz, M. M., y Barquez, R. M. (2011). Taxonomy and Distribution of *Nonnapsylla* (Siphonaptera: Stephanocircidae: Craneopsyllinae). *Journal of Parasitology*, 97(5), 954-955.

Lareschi, M., Sánchez, J. P., y Autino, A. (2016). A review of the fleas (Insecta: Siphonaptera) from Argentina. *Zootaxa*, 4103.

Leigh, J. W., y Bryant, D. (2015). popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110-1116.

León, R. J. C., Bran, D., Collantes, M., Paruelo, J. M. y Soriano, A. (1998) Grandes unidades de vegetación de la Patagonia extra andina. *Ecología Austral* 8, 125–144.

Lessa, E. P., D'Elia G., y Pardiñas U. F. J. (2010). Genetic footprints of late Quaternary climate change in the diversity of Patagonian-Fuegian rodents. *Molecular Ecology* 19, 3031-3037.

Lessa, E. P., D'Elía, G., Pardiñas, U. F. J., Patterson, B. D., y Costa, L. P. (2012). Mammalian biogeography of Patagonia and Tierra del Fuego. *Bones, clones, and biomes: an*, 379-398.

Li S., Jovelín R., Yoshiga T., Tanaka R., y Cutter A. D. (2014). Specialist versus generalist life histories and nucleotide diversity in *Caenorhabditis* nematodes. *Proceedings. Biological Sciences* 281: 2858.

Librado, P., y Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451-1452.

Linardi, P. M. y de Avelar, D. M. (2014). Neosomes of tungid fleas on wild and domestic animals. *Parasitology Research*, 113, 3517–3533.

Linardi, P. M., y Guimarães, L. R. (2000). Sifonápteros do Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(3), 433.

Linardi, P. M., y Krasnov, B. R. (2012). Patterns of diversity and abundance of fleas (Insecta: Siphonaptera) and mites (Acari: Mesostigmata) in the Neotropics: host-related, parasite related and environment-related factors. *Medical and Veterinary Entomology*, 27, 49–58.

Litt, M., y Luty, J. A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American journal of human genetics*, 44(3), 397.

López Berrizbeitia M. F., Sánchez J. P., Lareschi M., Barquez R., y Díaz M. (2015). Redescription of *Neotyphloceras crassispina hemisus* Jordan (Siphonaptera: Ctenophthalmidae: Neotyphloceratini). *Journal of Parasitology*, 101 (2): 145-149.

López Berrizbeitia, M. F. (2018). Sifonápteros de Micromamíferos (Didelphimorphia, Chiroptera y Rodentia) del Noroeste Argentino: Sistemática y Distribución. [Tesis doctoral, Universidad Nacional de Tucumán].

López Berrizbeitia, M. F., Sánchez J. P., Barquez, R.M y Díaz M. (2020). Taxonomic revision of the flea genus *Agastopsylla* Jordan & Rothschild 1923 (Siphonaptera: Ctenophthalmidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 92.

Lynch, M., y Jarrell, P. E. (1993). A method for calibrating molecular clocks and its application to animal mitochondrial DNA. *Genetics*, 135(4), 1197-1208.

Marshall, A. G. (1981). *The ecology of ectoparasitic insects*. Academic Press Inc.

Medvedev, S. G. (2000). Fauna and host-parasite associations of fleas (Siphonaptera) in different zoogeographical regions of the world: I. *Entomological Review*, 80, 409-435.

Medvedev, S. G., y Krasnov, B. R. (2006). Fleas: permanent satellites of small mammals. En *Micromammals and macroparasites* (pp. 161-177). Springer, Tokyo.

Morrone, J. J. (2006) Biogeographic areas and transition zones of Latin American and the Caribbean Islands based on the panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. *Annual Review of Entomology* 51, 467–494.

Navone, G. T., Ezquiaga, M. C., Notarnicola, J., y Jiménez, F. A. (2010). A new species of *Cyclobulura* (Nematoda: Subuluridae) from *Zaedyus pichi* and *Chaetophractus vellerosus* (Xenarthra: Dasypodidae) in Argentina. *Journal of Parasitology*, 96(6), 1191-1196.

Pampiglione, S., Fioravanti, M. L., Gustinelli, A., Onore, G., Mantovani, B., Luchetti, A., y Trentini, M. (2009). Sand flea (*Tunga* spp.) infections in humans and domestic animals: state of the art. *Medical and Veterinary Entomology*, 23(3), 172-186.

Pardiñas, U. F., Teta, P., D'Elia G., y Lessa, E. P. (2011). The evolutionary history of sigmodontine rodents in Patagonia and Tierra del Fuego. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103(2), 495-513.

Pardiñas, U. F., Patton, J. L., y D'Elía, G. (Eds.). (2015). *Mammals of South America, volume 2: rodents*. University of Chicago Press.

Paruelo, J. M., Jobbágy, E. G., Sala, O. E., Lauenroth, W. K. y Burke, I. C. (1998) Functional and structural convergence of temperate grassland and shrubland ecosystems. *Ecological Applications* 8, 194–206.

Paternina, L. E., Verbel-Vergara, D., y Bejarano, E. E. (2016) Comparación y utilidad de las regiones mitocondriales de los genes 16S y COX1 para los análisis genéticos en garrapatas (Acari: Ixodidae). *Biomédica*, 36, 295-302.

Poulin, R. (2011). Evolutionary ecology of parasites. En *Evolutionary ecology of parasites*. Princeton university press.

Rabassa, J. (2008). Late Cenozoic of Patagonia and Tierra del Fuego. En *The Late Cenozoic of Patagonia and Tierra del Fuego: Developments in Quaternary Science* (pp-151–204). Elsevier Science.

Rothschild, M. (1992). Neosomy in fleas, and the sessile life-style. *Journal of Zoology*, 226(4), 613-629.

Rothschild, W. (1903). A revision of the lepidopterous family Sphingidae. *Novitates Zoologicae*, 9, 1-972.

Rothschild, N. C. (1904). Description of a new species of Siphonaptera from South America. *Revista Chilena de Historia Natural*, 8, 147.

Rothschild, N.C. (1914). New Siphonaptera from Peru. *Novitates Zoologicae*, 21, 239–251.

Sánchez, J. P., Amor, V., Bazan-Leon, E. A., Vasquez, R. A., y Lareschi, M. (2012). Redescription of *Neotyphloceras chilensis* Jordan, new status (Siphonaptera: Ctenophthalmidae: Neotyphloceratini). *Zootaxa*, 3259(1), 51-57.

Sánchez, J. P. (2013). *Sifonápteros parásitos de los roedores sigmodontinos de la Patagonia norte de la Argentina: estudios sistemáticos y ecológicos*. [Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata].

Sánchez, J. P., y Lareschi, M. (2014). Two new species of *Neotyphloceras* (Siphonaptera: Ctenophthalmidae) from Argentinean Patagonia. *Zootaxa*, 3784(2), 159-170.

Sánchez, J. P., Beaucorunu, J. C., y Lareschi, M. (2015). Revision of fleas of the genus *Plocopsylla* belonging to the 'angusticeps–lewisii' complex in the Andean biogeographic region, with the description of a new species. *Medical and Veterinary Entomology*, 29(2), 147-158.

Sánchez, J. P., Lareschi, M., Salazar-Bravo, J., y Gardner, S. L. (2018). Fleas of the genus *Neotyphloceras* associated with rodents from Bolivia: new host and distributional records, description of a new species and remarks on the morphology of *Neotyphloceras rosenbergi*. *Medical and veterinary entomology*, 32(4), 462-472.

Sánchez, J. P., y Lareschi, M. (2019). Diversity, distribution and parasitism rates of fleas (Insecta: Siphonaptera) on sigmodontine rodents (Cricetidae) from Argentinian Patagonia. *Bulletin of entomological research*, 109(1), 72-83.

Scheffers, B. R., Joppa, L. N., Pimm, S. L. y Laurance, W. F. (2012) What we know and don't know about Earth's missing biodiversity. *Trends in Ecology y Evolution*, 27, 501–510.

Schneider, M. C., Najera, P., Aldighieri, S., Galan, D. I., Bertherat, E., Ruiz, A Dumit, E., Gabastou, J. M. y Espinal, M. A. (2014). Where does human plague still persist in Latin America?. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(2), e2680.

Schulman A. H. (2007). Molecular markers to assess genetic diversity. *Euphytica*, 158:313-321.

Sepp, R., Szabó, I., Uda H., y Sakamoto, H. (1994). "Rapid techniques for DNA extraction from routinely processed archival tissue for use in PCR". *Journal of clinical pathology*, 47(4), 318-323.

Simmons, R. B., y Weller, S. J. (2001). Utility and evolution of cytochrome b in insects. *Molecular phylogenetics and evolution*, 20(2), 196-210.

Šlapeta, J., Lawrence, A. y Reichel, M. P., (2018). Cat fleas (*Ctenocephalides felis*) carrying *Rickettsia felis* and *Bartonella* species in Hong Kong. *Parasitology International*, 67, 209–212.

Smit, F. G. A. M. (1968). Siphonaptera taken in formalin traps in Chile. *Zoologischer Anzeiger*, 180: 220-228.

Smit, F. G. A. M. (1987). *An illustrated catalogue of the Rothschild collection of fleas: Malacopsylloidea*. Oxford University Press.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., y Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30 (12), 2725-2729.

Thielsch, A., Knell, A., Mohammadyari, A., Petrusek, A., y Schwenk, K. (2017). Divergent clades or cryptic species? Mito-nuclear discordance in a *Daphnia* species complex. *BMC Evolutionary Biology*, 22(17), 227.

Urdapilleta, M., Linardi, P. M. y Lareschi, M. (2019). Fleas associated with sigmodontine rodents and marsupials from the Paranaense Forest in Northeastern Argentina. *Acta Tropica*, 193, 71-77.

Whiting, M. F., Whiting, A. S., y Hastriter, M. W. (2003). A comprehensive phylogeny of Mecoptera and Siphonaptera. *Entomologische Abhandlungen*, 61, 169.

Whiting, M. F., Whiting, A. S., Hastriter, M. W., y Dittmar, K. (2008). A molecular phylogeny of fleas (Insecta: Siphonaptera): origins and host associations. *Cladistics*, 24(5), 677-707.

Wobeser, G., Campbell, G. D., Dallaire, A., y McBurney, S. (2009). Tularemia, plague, yersiniosis, and Tyzzer's disease in wild rodents and lagomorphs in Canada: A review. *The Canadian Veterinary Journal*, 50(12), 1251.

Xiao, J. H., Wang, N. X., Li, Y. W., Murphy, R.W., Wan, D. G., Niu, L. M., Hu, H. Y., Fu, Y. G., y Huang, D. W. (2010). Molecular approaches to identify cryptic species and

polymorphic species within a complex community of Fig. wasps. *PLoS One*, 5(11), e15067.

Zurita, A., Callejón, R., de Rojas, M., Halajian, A., y Cutillas, C. (2016). *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis*: introgressive hybridization? *Systematic Entomology*, 41, 567–579.

Zurita, A., Callejón, R., de Rojas, M., y Cutillas, C. (2018). Morphological, biometrical and molecular characterization of *Archaeopsylla erinacei* (Bouché, 1835). *Bulletin of Entomological Research*, 22, 1–13.

Zurita, A., y Cutillas, C. (2021). Combination of nuclear and mitochondrial markers as a useful tool to identify *Ctenophthalmus* species and subspecies (Siphonaptera: Ctenophthalmidae). *Organisms Diversity & Evolution*, 21(3), 547-559.

Zhang, D. X., y Hewitt, G. M. (1997). Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies. *Biochemical Systematics and Ecology*, 25(2), 99-120.

Zhang, Y., Nie, Y., Li, L. Y., Chen, S. Y., Liu, G. H., y Liu, W. (2022). Population genetics and genetic variation of *Ctenocephalides felis* and *Pulex irritans* in China by analysis of nuclear and mitochondrial genes. *Parasites & Vectors*, 15(1), 1-13.

Zhu, Q., Hastriter, M. W., Whiting, M. F., y Dittmar, K. (2015). Fleas (Siphonaptera) are Cretaceous, and evolved with Theria. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 90, 129–139.

9. ANEXOS

ANEXO 1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO MEDIANTE CHELEX X100 MODIFICADO

- 1) Corte de cada ectoparásito, con bisturí y bajo lupa, con 20 µl de resina Chelex para evitar la desecación, en el primer segmento abdominal.
- 2) Esterilización de piezas utilizadas con alcohol 96°C y posterior mechero Bunzen.
- 3) Adición de 200 µl de resina Chelex (5%) y 5 µl de proteinasa a cada muestra. Es fundamental la previa agitación manual de la resina para evitar su precipitación.
- 4) Vórtex y *spin*.
- 5) Baño térmico a 56°C durante 18 horas.
- 6) Vórtex y *spin*.
- 7) Termobloque a 95°C durante 8 minutos.
- 8) Vórtex.
- 9) Centrifugación (14 r.p.m) durante 5 minutos.
- 10) Toma de 50 µl de sobrenadante para posterior análisis molecular.

ANEXO 2. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO MEDIANTE CTAB (DOYLE Y DOYLE, 1987)

1) Añadir 100 µl de CTAB calentado previamente a 60°C (buffer de lisis que disgrega las membranas celulares y produce la ruptura celular) a un tubo de 1,5 ml.

2) Seleccionar una pulga individual, secar brevemente sobre papel absorbente para eliminar el exceso de alcohol y colocarla sobre un portaobjetos de vidrio.

3) Con ayuda de una aguja y bajo visualización en lupa, hacer un corte en el primer segmento abdominal de la pulga, de manera que los otros segmentos abdominales y genitalia queden intactos para su posterior identificación a nivel de especie, conservados en tubos *ependorf* con alcohol 96%.

4) Colocar la parte anterior de la pulga (incluye cabeza y segmentos torácicos) en el tubo que contiene CTAB, asegurándose de que se hunda en la solución y no flote o quede unido a las paredes del tubo. Machacar con un mortero todo lo que sea posible.

5) Añadir 15 µl de proteinasa K en el tubo con la pulga para digerir las proteínas y eliminar la contaminación, facilitando la liberación del ácido nucleico.

6) Agitar el tubo y colocarlo en un baño de agua, durante 24 horas, a 60 °C (temperatura óptima de la enzima).

7) Después de las primeras 24h, añadir 15 µl más de proteinasa al tubo y colocarlo de nuevo en el baño a 60 °C durante 24 horas más.

8) Agitar el tubo para mezclar las soluciones periódicamente a lo largo de estas 48h de baño, para asegurarse de que la muestra esté en contacto con el CTAB y la proteinasa.

9) Retirar el tubo del baño, mezclar el contenido y añadir 96 µl de cloroformo y 4 µl de alcohol isoamílico (24:1), agitar durante 5 minutos. Observar la formación de 2 fases.

10) Centrifugar el tubo a 12000 r.p.m durante 10 minutos para facilitar la separación de las fases.

11) Retirar el sobrenadante que contiene el ácido nucleico y colocarlo en un tubo nuevo. Descartar el tubo viejo con el precipitado que contiene los restos celulares.

12) Añadir 40 µl de etanol absoluto en el tubo que contiene el sobrenadante.

13) Agitar suavemente hasta que esté homogéneo.

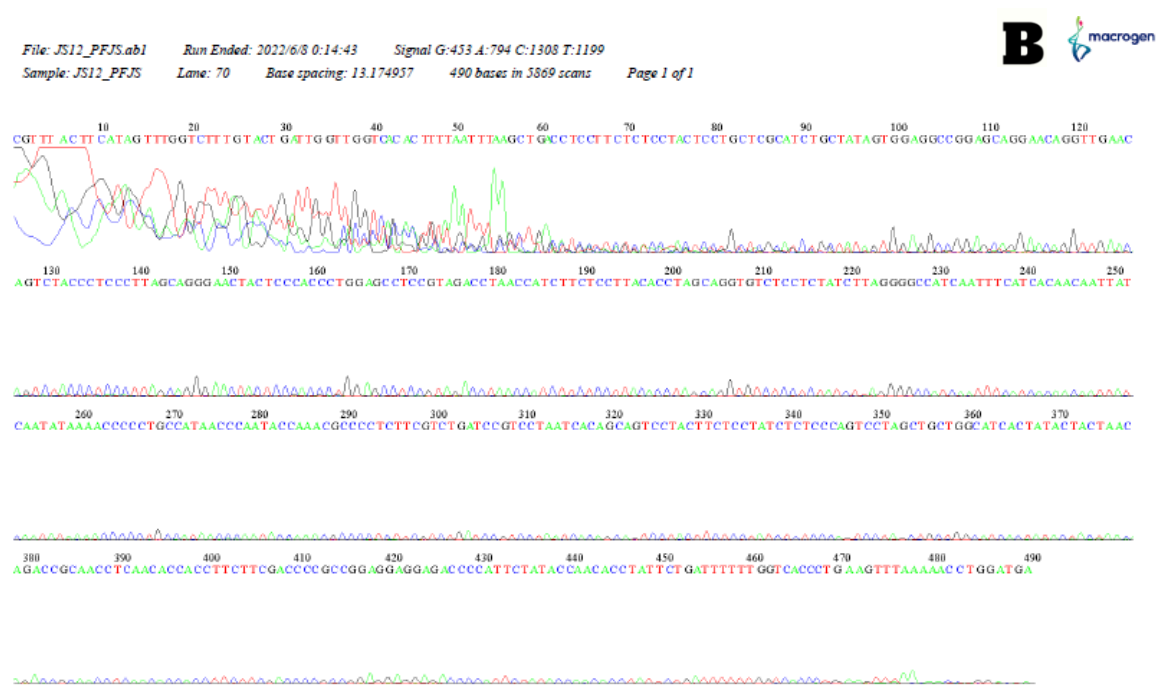
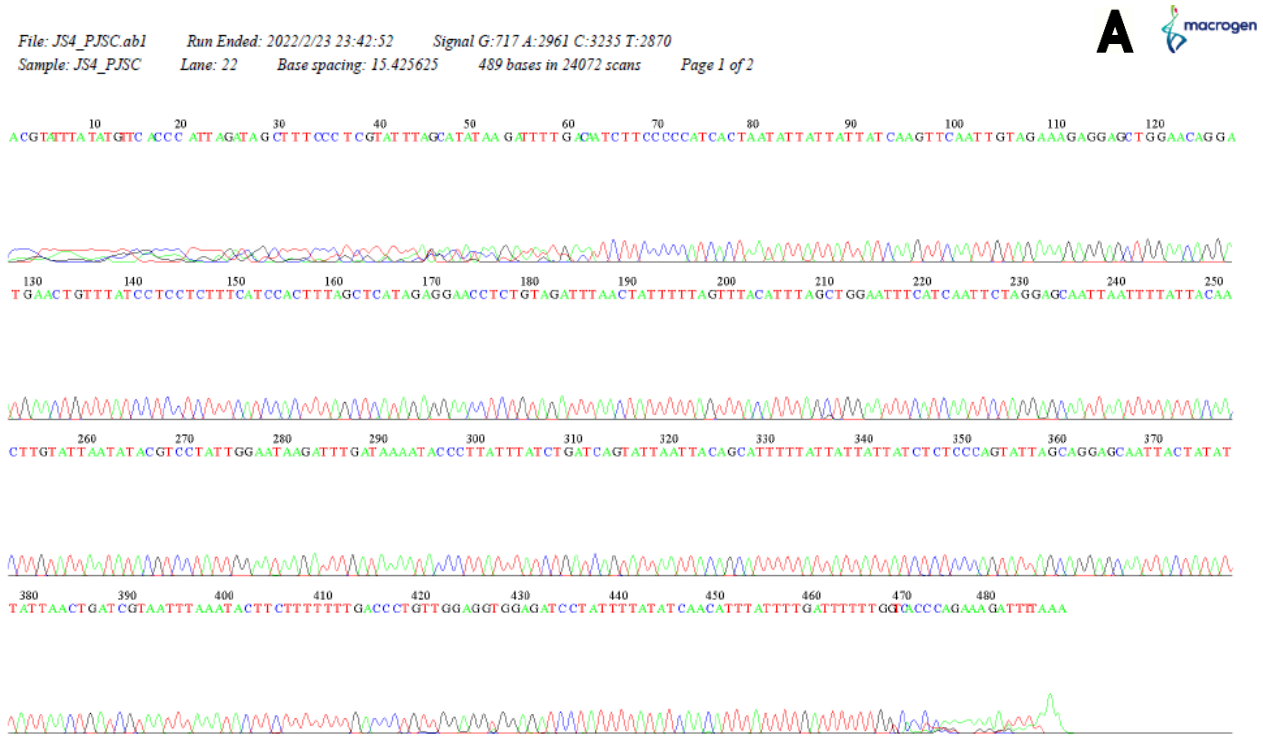
- 14) Llevar a freezer para precipitar durante 24 horas.
- 15) Centrifugar el tubo a 12000 r.p.m durante 10 minutos.
- 16) Descartar el líquido y añadir 500 µl de alcohol absoluto, con el fin de que precipite el ADN.
- 17) Centrifugar de nuevo a 12000 r.p.m durante 10 minutos.
- 18) Descartar el líquido y dejar el tubo abierto, cubierto con papel absorbente en estufa hasta que el alcohol se seque.
- 18) Añadir 30-50 µl de agua de inyección.
- 19) Colocar en baño a 37°C durante 2 horas o dejar toda la noche en el refrigerador.
- 20) Congelación para Stock.

RECOMENDACIONES:

- Los morteros deben desecharse después de cada uso.
- Es mejor dar preferencia a los individuos menos congestionados, porque la sangre del huésped podría terminar prevaleciendo sobre la del ectoparásito.
- Es muy importante mover los tubos de vez en cuando a lo largo de las 48h en el baño.
- Al retirar el sobrenadante (paso 8) ver que la misma parte venga absolutamente limpio, sin contaminación de líquido en la parte que está la pulga. Es mejor tomar menos sobrenadante pero no contaminar la muestra.
- Para hacer la elución se usa agua de inyección debido a que el TE termina por echar a perder la PCR. La cantidad de ADN obtenida es pequeña, así que no se hacen diluciones a la PCR, en la que se usan 3-5 µl del producto de extracción.
- El paso 11 se realiza de manera que se pueda identificar la especie de la pulga después de la extracción. Generalmente las muestras ya se aclaran después del procedimiento.

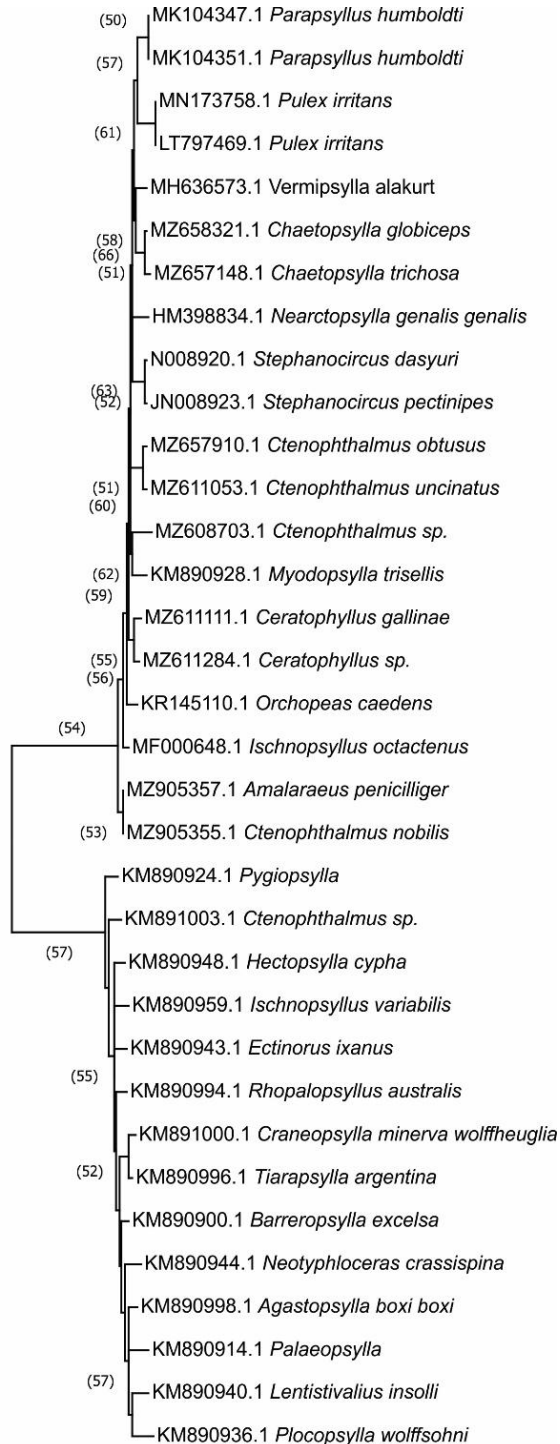
ANEXO 3. CROMATOGRAMAS OBTENIDOS MEDIANTE SECUENCIACIÓN ESTÁNDAR

Cromatogramas productos de una secuenciación estándar para el marcador mitocondrial COI brindado por la empresa MacroGen® (Corea del Sur). (A) Secuenciación exitosa. (B) Secuenciación fallida. En la parte superior se puede observar los datos más relevantes como ser: el número de muestra (*Sample*), la fecha que se realizó la secuenciación, el número de pares de bases detectados (489); mientras que en la parte inferior se visualiza el cromatograma propiamente dicho, en donde cada pico con su respectivo color corresponde a un nucleótido (A: verde, T: rojo; G: negro y C: azul) y la altura de éstos a la probabilidad de dicha identidad. Finalmente, el conjunto de estos picos ordenados corresponde a la secuencia de ADN del fragmento de interés.



ANEXO 4. ÁRBOL FILOGENÉTICO A PARTIR DE UN FRAGMENTO DE 415 PB DEL GEN COI

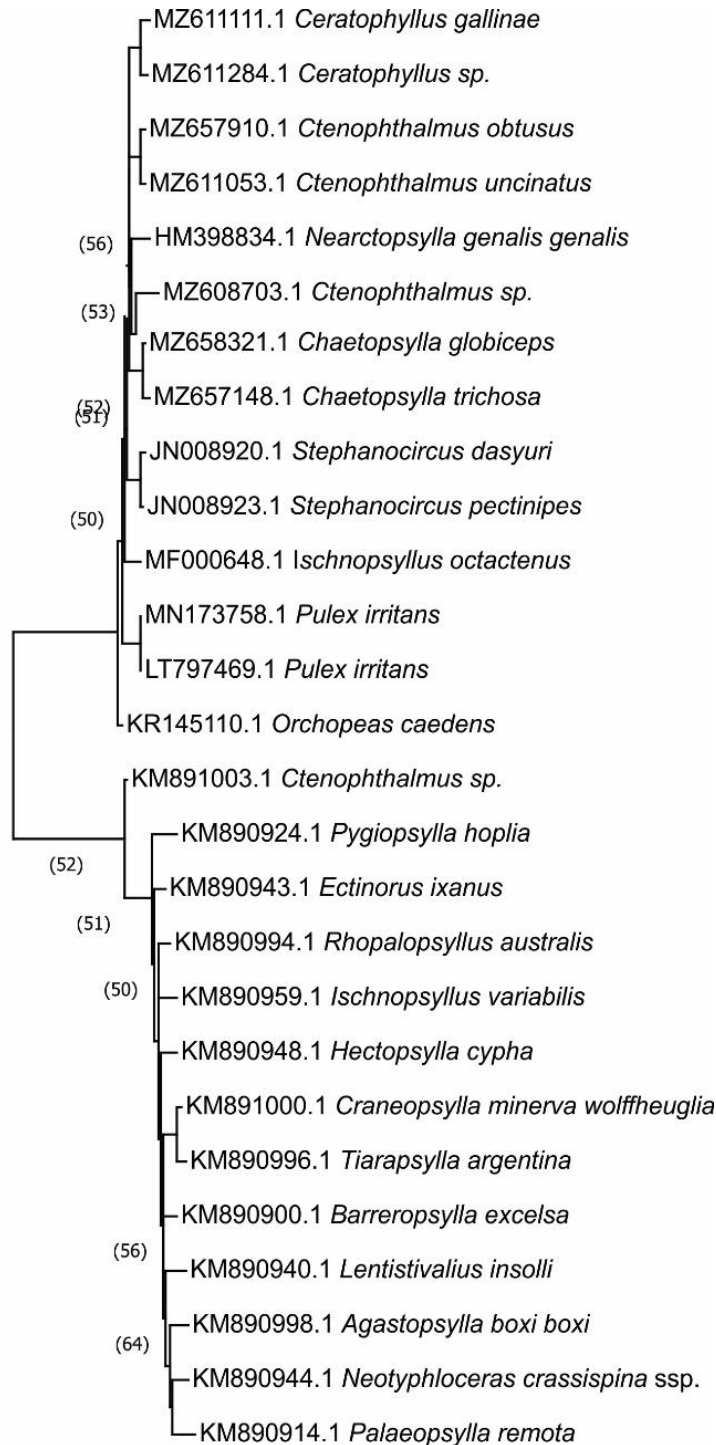
Árbol filogenético obtenido mediante la metodología de *NJ* a partir de un fragmento de 415 pb del gen COI analizado para 34 secuencias de Siphonaptera obtenidas de *GenBank*. En los nodos se observan los valores de *bootstrap* mayores o iguales a 50.



0.20

ANEXO 5. ÁRBOL FILOGENÉTICO A PARTIR DE UN FRAGMENTO DE 635 PB DEL GEN COI

Árbol filogenético obtenido mediante la metodología de *NJ* a partir de un fragmento de 635 pb del gen COI analizado para 27 secuencias de Siphonaptera obtenidas de *GenBank*. En los nodos se observan los valores de *bootstrap* mayores o iguales a 50.



0.20